

FREISETZUNG
GEGENREGULATORISCHER HORMONE
NACH INJEKTION VON HUMAN- UND
SCHWEINEINSULIN BEI GESUNDEN
PROBANDEN UND PATIENTEN MIT
HYPOPHYSÄREN STÖRUNGEN

Inge Brügelmann

Duss
München
1906.

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität
München

Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

FREISETZUNG GEGENREGULATORISCHER HORMONE NACH INJEKTION
VON HUMAN- UND SCHWEINEINSULIN BEI GESUNDEN PROBANDEN
UND PATIENTEN MIT HYPOPHYSÄREN STÖRUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Inge Brügelmann
aus
Rosenheim
München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Landgraf

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.86

Meinen Eltern gewidmet.

FREISETZUNG GEGENREGULATORISCHER HORMONE NACH INJEKTION
VON HUMAN- UND SCHWEINEINSULIN BEI GESUNDEN PROBANDEN
UND PATIENTEN MITHYPOPHYSÄREN ERKRANKUNGEN

1. EINLEITUNG

1.1. Geschichte des Insulins (1 - 7)

1.2. Möglichkeiten der Gewinnung von Humaninsulin (7 ff.)

1.2.1. Pankreasextrahiertes Humaninsulin (7 - 8)

1.2.2. Vollsynthetisches Humaninsulin (8 - 9)

1.2.3. Semisynthetisches Humaninsulin (9 - 12)

1.2.4. Biosynthetisches Humaninsulin (12 - 21)

1.3. Die Streßreaktion (22 ff.)

1.3.1. Auslösung und Gegenregulierung (23 - 25)

1.3.2. Der Hypoglykämiestreß (26 - 27)

2. THEMA DER ARBEIT (27 - 28)

3. METHODIK

3.1. Personen und Material (28 - 33)

3.2. Protokoll (33 ff.)

3.2.1. Intracutan-Test (33)

3.2.2. Oraler Glucose-Toleranztest (34)

3.2.3. Insulin-Hypoglykämietest (34 - 37)

3.3. Analytik (38 ff.)

3.3.1. Glucose (38)

2. Kalium (38)

3. Insulin (38 - 39)

4. C-Peptid (39)

5. Glucagon (40 - 41)

3.3.6. Wachstumshormon (hGH) (41)

7. Prolactin (hPRL) (41)

8. ACTH (42)

9. Cortisol (42)

10. Catecholamine (43)

3.4. Berechnungen und statistische Methoden (43 - 45)

4. ERGEBNISSE (46 ff.)

4.1. Intracutantest (46)

4.2. OGIT (47)

4.3. Subjektive Symptome (47 - 49)

4.4. Kurvenbeschreibung und statistische Auswertung (50 ff.)

4.4.1. Insulin (50)

2. C-Peptid (51)

3. Blutglucose (51 - 52)

4. Glucagon (52 - 54)

5. ACTH (54 - 55)

6. Cortisol (55 - 56)

7. Adrenalin (60)

8. Noradrenalin (61 - 62)

9. Wachstumshormon (hGH) (63)

10. Prolactin (hPRL) (64 - 66)

11. Kalium (70 - 71)

5. DISKUSSION (75 - 85)

6. ABBILDUNGEN

Abb. 6: Profile von Blutglucose, C-Peptid, Insulin, Glucagon, und Cortisol nach Applikation von 0.12 I.U./kg KG BHI und PPI bei gesunden Probanden. (57)

- Abb. 7: Profile von Blutglucose, C-Peptid, Insulin, Glucagon und Cortisol nach Injektion von 0.075 I.U. BHI und PPI bei gesunden Probanden (58)
- Abb. 8: Profile von Blutglucose, C-Peptid, Insulin, Glucagon und Cortisol nach Injektion von BHI oder PPI bei zwei Gruppen von Patienten mit hypophysären Störungen (59)
- Abb. 9: Profile der gegenregulierenden Hormone nach Injektion von 0.12 I.U. BHI oder PPI bei gesunden Probanden (67)
- Abb. 10: Profile der gegenregulierenden Hormone nach Injektion von 0.075 I.U. BHI oder PPI bei gesunden Probanden (68)
- Abb. 11: Profile der gegenregulierenden Hormone nach Injektion von BHI oder PPI bei Patienten mit hypophysären Störungen (69)
- Abb. 12: Verlauf des Kaliums in Abhängigkeit des Blutglucose-Spiegels nach Injektion von 0.12 I.U. BHI oder PPI bei gesunden Probanden (72)
- Abb. 13: Verlauf des Kaliums in Abhängigkeit des Blutglucose-Spiegels nach Injektion von 0.075 I.U. BHI oder PPI bei gesunden Probanden (73)
- Abb. 14: Verlauf des Kaliums in Abhängigkeit des Blutglucose-Spiegels nach Injektion von BHI oder PPI bei zwei Gruppen von Patienten mit hypophysären Störungen (74)

1.1. Die Geschichte des Insulins

Bereits im 17. Jht. provozierte der Düsseldorfer Arzt Conrad Brunner Symptome eines Diabetes mellitus durch eine subtotale Pankreatektomie am Hund. Der verbliebene Rest der Drüse konnte die Tiere jedoch am Leben erhalten. Dies führte zu der Fehldeutung, daß das Pankreas kein lebenswichtiges Organ sei und blockierte die weitere Forschung für ca. 150 Jahre.

Wichtige Erkenntnisse gewann erst Claude Bernard Mitte des 19. Jhts. mit seinen "Abschnürungsversuchen des Pankreas", die ein völliges Versiegen der exokrinen Funktion zur Folge hatten, die endokrine Sekretion jedoch unbeeinflußt ließen. Auf die endokrine Bedeutung des Pankreas machte als erster Rudolf Virchow 1854 aufmerksam. Sein Doktorand Paul Langerhans untersuchte Ende des 19. Jhts. die Mikrostruktur der Bauchspeicheldrüse näher. In seiner bekannten Dissertation schreibt er bereits über die Existenz der später nach ihm benannten Inselzellen. 1889 provozierten von Mering und Minkowski durch eine Pankreasexstirpation einen Diabetes mellitus mit ketoazidotischem Koma am Hund. Die Rolle der Pankreasfunktion in der Ätiologie des Diabetes war erkannt.

Um die Jahrhundertwende wurden die B-Zellen als Bildungsort des blutzuckersenkenden Agens erkannt. Die Isolierung des Hormons stieß zunächst auf Schwierigkeiten, da die Proteasen des exokrinen Pankreasanteils bei der Aufarbeitung des Drüsenmaterials das Insulin zerstörten. Erst 1921 gelang Banting und Best die eigentliche Entdeckung des Insulins mit der Isolierung und Darstellung des gereinigten Hormons. An ihrem pankreatektomierten Versuchshund "Majorie" kam Insulin in Form eines gereinigten Pankreasextraktes erstmals erfolgreich zum Einsatz. Im Versuchsprotokoll taucht das

Hormon noch unter dem Namen "Isletin" auf, der wenig später auf Insulin geändert wurde. Erste klinische Erfahrungen konnte der amerikanische Internist Elliot P. Joslin sammeln, der 1923 eine Dosierungsvorschrift bei über 350 Patienten zusammenstellte. Die Insulinproduktion aus Rinder- und Schweinedrüsen konnte beginnen.

Dem Engländer Frederick Sanger gelang 1958 die Strukturaufklärung von Rinderinsulin; zwei Jahre später wurde die AS-Sequenz von Humaninsulin beschrieben. Zwischen 1963 und 65 glückte drei Arbeitsgruppen in Westdeutschland, China und den USA die Totalsynthese von Humaninsulin, dessen hohe Herstellungskosten eine therapeutische Anwendung jedoch ausschließt (133, 63). Die Extraktion von Insulin aus menschlichem Pankreasmaterial hatte bereits zu Beginn der 60er Jahre begonnen. Insulin als Therapeutikum war nun eingeführt. Die kurze Halbwertszeit von Altinsulin ließ in der Diabetesbehandlung noch viel zu wünschen übrig: schwere Diabetiker mußten spätestens alle 4 - 6 Stunden substituiert werden. 1935 stellte H.C. Hagedorn in Kopenhagen erstmals "Protamin Insulinat" oder "Insulin retard" vor. Man hatte herausgefunden, daß sich durch Mischen von Insulin mit einer protaminhaltigen Pufferlösung ein Präzipitat bildet. Nach s.c.-Injektion dieser Suspension wurde Insulin nur allmählich aus seinem Depot verfügbar gemacht. Die Weiterentwicklung bestand in der Zugabe von Zinkionen; es entstand das Protamin-Zink-Insulin (PZI). Durch Kombination der beiden zeitlich extrem wirkenden Insuline Alt und PZI entstanden die mittelwirkenden Insuline, die eine immer optimalere Einstellung der Patienten zuließen. Die kristalline Form Isophan-Insulin zeichnete sich durch große Haltbarkeit aus und eroberte sich als Neutrales Protamininsulin Hagedorn (NPH) einen festen Platz in der Therapie des Diabetes mellitus.

Die weitere Forschung beschäftigte sich nun mit der reinen Darstellung und chemischen Charakterisierung von Insulin. Die Produktion des Hormons aus Rinder- und Schweinedrüsen konnte anlaufen, nachdem Abel 1926 erstmals Insulin in kristalliner Form gewonnen hatte. 1928 zeigten die Wissenschaftler Wintersteiner, du Vignaud und Jensen, daß Insulin als reines Protein nur aus α -AS zusammengesetzt ist. Die Erkenntnis, daß es aus zwei Eiweißketten besteht, die über Disulfidbrücken zusammengehalten werden, geht auf den Engländer Frederick Sanger zurück. Ihm und seinen Mitarbeitern gelang es in den darauffolgenden zehn Jahren auch, die Primärstrukturen der verschiedenen Insuline verschiedener Spezies zu ermitteln (101, 63).

Die Erforschung des Humaninsulins begann um das Jahr 1960, als Verfahren zur Extraktion von Insulin aus menschlichen Bauchspeicheldrüsen verfügbar waren und Nicol und Smith (33) die AS-Sequenz des Humaninsulins beschrieben hatten.



Abb. 1: Humaninsulin

"Alles spricht dafür, nichts spricht dagegen".

Dieser Ausspruch über biosynthetisches Humaninsulin fiel auf dem Symposium im Oktober 82 in Neu-Ulm (112). Es spiegelt sich darin die große Anfangseuphorie wieder, von der die ersten Ergebnisse im klinischen Einsatz von biosynthetisch produziertem Humaninsulin begleitet waren. Eine neue Ära in der Behandlung des Diabetes mellitus schien eingeläutet zu sein.

Diese Krankheit nimmt wegen ihrer Häufigkeit, ihrer Chronizität und ihrer vielfältigen Komplikationen eine besondere Stellung in der Medizin ein. Die Angaben über manifeste Diabetiker in Mitteleuropa schwanken zwischen 2 und 4 %, wobei sich Schätzungen über potentiell diabetesgefährdete Menschen auf ca. 15 % belaufen (67).

Seit 1922 der erste Typ I-Diabetiker mit Insulin in Form eines relativ unreinen Pankreasextrakts aus Rinderdrüsen behandelt worden war, bemüht man sich, die Therapie dieser unheilbaren Krankheit zu optimieren.

Von Beginn an wurden immunologische Nebeneffekte dieser Therapie, im wesentlichen in Form der verschiedenen Typen einer Insulin-Allergie, als erhöhter Insulin-Bedarf bis zur Insulin-Resistenz und als Lipodystrophie (Lipoatrophie - Lipohypertrophie) beobachtet. Im Verlauf der zurückliegenden Jahrzehnte konnte durch mehr und mehr verfeinerte Reinigungsverfahren - vor allem durch die 1970 eingeführten chromatographierten Insuline ein entscheidender Rückgang dieser immunologischen Nebeneffekte beobachtet werden. Diskutiert werden unter anderem Verunreinigungen mit exokrinem Material, insulinverwandte Proteine (Proinsulin etc.), Zinkgehalt, Speziesunterschiede, Applikationsweise und -ort, genetische Faktoren (38). Die Frage nach der Wertigkeit dieser Faktoren im einzelnen blieb bisher noch offen. Eine Antikörperbildung tritt auch nach Applikation von Human-

insulin auf (135,105), wenngleich in wesentlich geringerem Maß.

Bisherige Untersuchungen hatten bezüglich der Antikörperbildung unterschiedliche Resultate ergeben. Schernthaler (102) fand bei Patienten mit präformierten Antikörpern keine unterschiedliche Bindung zwischen Human- und Schweineinsulin an IgG-Antikörper. Bei Patienten mit Insulin-Resistenz konnte er eine geringere Affinität des Humaninsulins feststellen. Kumar et al. (65) untersuchten die Immunoreaktivität von Human- und Schweineinsulin an präformierten Insulin-Antikörpern vom IgG-Typ bei Insulin-behandelten Diabetikern und fanden eine signifikant niedrigere prozentuale Bindung von Humaninsulin. Der Unterschied ergab sich vor allem bei Seren mit hohem Antikörperspiegel, der klinisch oft mit einer bestehenden Insulin-Resistenz assoziiert ist. Untersuchungen mit IgE-Antikörpern, auch die Indices der Lymphozyten-Transformation unterschieden sich nicht.

Schweineinsulin wirkt weniger antigen als Rinderinsulin und dennoch kann es zu einer klinisch relevanten Antikörper-Bildung und somit einer Erniedrigung des Spiegels des freien biologisch aktiven Insulins führen. Da gleichzeitig die biologische Halbwertszeit des Hormons verlängert wird, resultiert letztlich eine Hyperinsulinämie, die als zusätzlicher Risikofaktor bei der Entstehung einer Arteriosklerose diskutiert wird (128). Die zirkulierenden Insulin-Antikörper sind möglicherweise bei der Pathogenese des diabetischen Spätsyndroms beteiligt (70).

Einen Rückgang der nach Schweineinsulin-Therapie gebildeten Antikörper infolge einer Umstellung der Behandlung auf Humaninsulin konnten einige Autoren beobachten (40, 108, 125, 38). Eine Vergleichsstudie mit Rinderinsulin (53) lieferte entsprechende Ergebnisse. Bei einer Gegenüberstellung dreier Gruppen diabetischer Pa-

tienten, die Rinder-, Schweine- und Humaninsulin erhalten hatten, differierten die erforderliche Insulindosis und die metabolischen Parameter nicht wesentlich (56). Bei einer Gruppe noch unbehandelter Diabetiker ließen sich nach einer 12-monatigen Therapie mit Humaninsulin bei 56 % der Patienten keine Insulin-Antikörper nachweisen. Der Unterschied zu den mit Schweineinsulin behandelten Patienten, die keine Antikörper entwickelt hatten (40 %) war mit $p < 0.01$ signifikant (41).

Diese Perspektiven sollten der Bereitstellung eines immunologisch inerten Insulins eine große Bedeutung beimessen. Die tierischen Insuline erfüllten trotz ihres hohen Reinheitsgrades die Erwartungen nicht. Erst die Entwicklung der Humaninsuline brachte nun ein dem endogenen Insulin identisches Präparat auf den Markt. Von den Möglichkeiten der Herstellung scheint sich die Produktion über eine Biosynthese besonders abzuzeichnen. Für die Humaninsulintherapie diabetischer Patienten spielt vor allem das aus Schweineinsulin präparierte semisynthetische und das biosynthetisch hergestellte Humaninsulin (BHI), dessen Produktion am billigsten ist, eine Rolle.

Während bereits die Einführung der hochgereinigten Monospezies-Insuline Anfang der 70er Jahre große Fortschritte hinsichtlich der Allergisierung brachten, erhofft man sich jetzt von den Humaninsulinen noch bessere Ergebnisse.

Die Zukunft der Therapie des Diabetes mellitus ist sicher in der Transplantation eines Pankreas bzw. isolierter Langerhans'scher Inseln oder in der künstlichen B-Zelle zu sehen. Eine definitive Bewertung der Humaninsuline kann erst nach einem entsprechenden Beobach-

tungszeitraum - speziell hinsichtlich immunologischer Aspekte - erfolgen und dann wird sich herausstellen, ob wirklich "alles dafür spricht".

1.2. Möglichkeiten der Gewinnung von Humaninsulin

Es stellten sich vier Möglichkeiten der Humaninsulingewinnung heraus, von denen allerdings nur die beiden letztgenannten Methoden eine wirtschaftliche Rolle spielen:

- 1.2.1. Extraktion des Insulins aus menschlichem Pankreasgewebe
- 1.2.2. Vollsynthese von Humaninsulin
- 1.2.3. Enzymatische Umwandlung von Schweineinsulin in Humaninsulin (Semisynthetisches Humaninsulin)
- 1.2.4. Biosynthetische Produktion von Humaninsulin mittels Gen-Technologie, z.B. durch Coli-Bakt. (Biosynthetisches Humaninsulin)

1.2.1. Pankreasextrahiertes Humaninsulin

Zu Beginn der 60er Jahre gelang erstmals die Darstellung eines kristallinen Humaninsulins aus Drüsenmaterial. Dieses Insulin kam vornehmlich als Referenzstandard im Radio-Immunassay (RIA) zur Anwendung. Yalow und Berson (145) untersuchten die Reaktionen von pankreasextrahiertem Humaninsulin und Schweineinsulin

im RIA und fanden keine signifikanten Unterschiede. Anwendungen dieses Humaninsulins bei Patienten, die durch tierische Insuline allergisiert waren, brachten positive Ergebnisse. Deckert et al. (31) beschrieben 1972 eine Antikörper-Bildung bei Patienten, denen pankreasextrahiertes Humaninsulin appliziert worden war. Sie schrieben den immunogenen Effekt der ungenügenden Reinigung des verwendeten Extraktes zu.

1.2.2. Vollsynthetisiertes Humaninsulin

1974 gelang bei Ciba-Geigy, Basel, die Totalsynthese von menschlichem Insulin unter gezielter Bildung der Disulfid-Verbindungen (118).

Tierexperimentell wurde gezeigt, daß dieses Insulin (CGP 12831) an fastenden Ratten über den ganzen Dosisbereich wie natürliches, extrahiertes humanes und tierisches Insulin wirkt (75).

Die gleichen Ergebnisse brachten Versuche an isolierten Fettzellen von Ratten hinsichtlich der Einbaurate von ^{14}C -markierter Glucose (75).

Teuscher (133) beschrieb in seiner Studie mit sechs diabetischen Patienten, daß vollsynthetisches humanes Insulin zur Behandlung des Diabetes mellitus - auch bei ketoacidotischer Entgleisung - ebenso gut verwendet werden könne wie Insuline tierischen Ursprungs.

Immunologische Untersuchungen mit diesem Insulin an zwölf diabetischen Patienten zeigten keine Nachteile im Vergleich zu Insulinen boviner bzw. porciner Herkunft (32). Es ergab sich jedoch, daß bei Patienten, die bereits eine Allergie auf tierische Insuline entwickelt hatten, auch bei synthetischem Insulin po-

sitive intradermale Hautreaktionen auftreten können.

1.2.3. Semisynthetisches Humaninsulin (SHI)

Die Synthese dieses Insulins geht von der Ähnlichkeit menschlichen Insulins mit Schweineinsulin aus, das sich nur durch die Aminosäure Alanin am C-terminalen Ende der B-Kette vom Humaninsulin unterscheidet.

	A-Kette		B-Kette
	A 8	A 10	B 30
Rind	Alanin	Valin	Alanin
Schwein	Threonin	Isoleucin	Alanin
Human	Threonin	Isoleucin	Threonin

Tab. 1: Unterschiede in der Aminosäuresequenz verschiedener Insulinspezies (86)

Über eine enzymatische Reaktion ist es möglich, das Alanin in Position B 30 des Schweineinsulins selektiv durch Threonin zu ersetzen und so eine Aminosäuresequenz zu erhalten, die genau der von genuinem Humaninsulin entspricht.

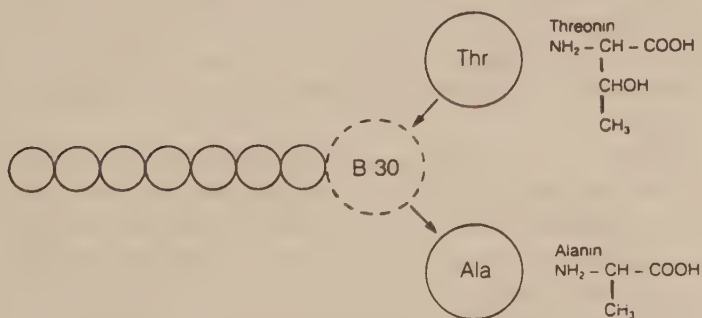


Abb. 2: Umwandlung von Schweine- zu Humaninsulin (78)

Die Verfügbarkeit dieses Insulins bleibt jedoch abhängig von der ausreichenden Bereitstellung der Schweinepankreatica, wobei von einigen Autoren ein Engpaß für Rohmaterial noch in diesem Jahrhundert vorausgesagt wird (106, 77).

Das Experten-Komitee der WHO sieht allerdings den Bedarf an tierischen Pankreasdrüsen auch in der Zukunft gedeckt. (144)

Markussen charakterisierte dieses Insulin (77) und bestätigt eine den herkömmlichen Insulinen identische Wirkung.

Untersuchungen mit Semisynthetischem Humaninsulin (SHI) an gesunden Probanden (Vergleichsinsulin Actrapid) zeigten bei Owens et al. (87) gleiche Ergebnisse. Nach s.c.-Injektion fanden sie keinen Unterschied der Stärke, des Eintritts und der Dauer der Wirkung von SHI zum Vergleichsinsulin. Zur Unterdrückung der endogenen Insulinproduktion applizierte er Somatostatin als Dauerinfusion. In einer weiteren Studie ohne Somatostatin konnte er die Ergebnisse bestätigen (88).

Von Home et al. (54) wurde die Wirkung des SHI an Probanden mit der Glucose-Clamp-Technik (i.v.) untersucht, die eine Bestimmung der biologischen Insulinaktivität ohne den Einfluß der gegenregulatorischen Hormone ermöglicht. Als Ergebnis stellte sich eine ähnliche Aktivität des SHI und des Vergleichsinsulins vom Schwein heraus.

Die Gruppen Adeniyi-Jones et al. (1) und Owens et al. (89) konnten bezüglich des Metabolismus und der hypoglykämischen Aktivität des SHI bei gesunden Probanden auch keine gravierenden Unterschiede zu einem Vergleichsinsulin vom Schwein eruieren.

Unterschiede fanden Laube et al. (72) und Sundermann et al. (130) bezüglich der Absorptionsprofile von SHI im Vergleich mit Schweineinsulin. Bei s.c.-Applikation

stellten sie einen stärkeren Blutzucker-Abfall (72), der sich nach i.v.-Applikation nicht wiederholte, bzw. eine schnellere Mobilisation des SHI aus dem subcutanen Depot (130) fest.

Auch Ebihara et al. (34) beschrieben eine erhöhte Bioverfügbarkeit des SHI unter s.c.-Anwendung.

Bei Sonnenberg et al. (124) war die s.c.-Absorption bei Probanden und Diabetikern unter regular-SHI signifikant höher als unter dem Vergleichsinsulin, wie sich in einem gesteigerten hypoglykämischen Effekt äußerte.

Gyaram et al. (49) beobachteten nach s.c.-Gabe von Human-Mono-Component-Insulin erhöhte Seruminsulinspiegel und einen stärkeren Blutzucker-senkenden Effekt im Glucose-Clamp-Test.

Die Langzeit-Studie an 40 Typ I-Diabetikern von Schernthaler et al. (103) zeigte eine geringere IgG-Insulin-AK-Bildung nach SHI-Therapie als nach MC-Schweineinsulintherapie.

Eine signifikante Abnahme der Immunogenität auf SHI im Vergleich zu Schweineinsulin beschrieben die Autoren auch in ihrer Studie an HLA-DR-typisierten Diabetikern (104). Bei der Ersteinstellung eines Diabetes mellitus mit SHI fanden Schumm et al. (114) eine Verbesserung der Stoffwechselkontrolle, gemessen an der HbA_{1c} -Bestimmung, und eine Senkung des täglichen Insulinbedarfs.

Keine Verbesserung der Immunogenität beschrieben Lingse et al (73) an insulinabhängigen Diabetikern. Auch die Stoffwechselparameter (HbA_{1c} , glykolysiertes Albumin, C-Peptid, Glucagon, Lipide und Routine-Laborparameter) unterschieden sich unter der SHI-Therapie nicht von denen des Vergleichsinsulins.

Sonnenberg et al. (123) stellten in ihrer Studie die gleiche Wirksamkeit von semisynthetischem Humaninsulin und Schweineinsulin heraus. Der beobachteten schnellen Resorption des SHI aus dem s.c.-Depot maßen sie

keine klinische Bedeutung bei.

In einer weiteren Studie an Typ I-Diabetikern wurde die Absorption und Insulin-Rezeptorbindung von SHI und Schweineinsulin untersucht (117), wobei weder Unterschiede der Blutglucosewerte noch der Bindungsaffinität der beiden Insuline resultierten.

1.2.4. Biosynthetisches Humaninsulin (BHI)

Der erste Schritt einer bakteriellen Produktion von Insulin wurde 1979 bei Genentech durch Goeddel et al. (46) getan. Es gelang ihnen, Mikroorganismen genetisch so zu manipulieren, daß diese Hormone produzieren konnten. Die erforderlichen Gene wurden durch eine chemische Nucleotidsynthese gewonnen (27) und - im Fall der Insulingewinnung - dem Bacterium Escherichia Coli eingepflanzt.

Diese sogenannte DNA-Rekombinationstechnologie (33) umfaßt folgende Schritte (am Bsp. Insulin):

1. Identifikation und Isolierung der Gene mit der Information der Insulinproduktion.
2. Insertion dieser Gene in eine Vektorzelle zur Darstellung neukombinierter DNA.
3. Einschleusung der neukombinierten DNA in eine Wirtszelle (E.coli).
4. Reproduktion der Zelle mit der neuen DNA zur Herstellung von Insulin.

E. coli, ein gramnegatives Stäbchen der normalen Darmflora des Menschen, wird bereits seit Jahrzehnten molekulargenetisch erforscht. Zur BHI-Synthese verwendet man einen humanapathogen-Stamm (K 12), der im Menschen zu keiner Koloniebildung mehr fähig ist. Die ge-

netische Information dieses Bakteriums liegt größtenteils in Chromosomen und nur ein Teil der DNA liegt extrachromosomal als Ring (= Plasmid) vor. Diese Plasmide tragen oft für die Trägerzelle wichtige neuerworbene Informationen, wie z.B. Antibiotikaresistenzen. Sie benutzen den Reproduktionsmechanismus der Zelle für ihre eigene Reproduktion. Solch ein Plasmid wird nun "genchirurgisch" um das in einer Nucleotidsynthese (27) dargestellte DNA-Stück, das die Information zur Insulinsynthese trägt, erweitert. Das Ergebnis dieses komplizierten Vorgangs, der eine Reihe enzymkatalysierter Schritte enthält, ist eine neukombinierte DNA, die nun in die Wirtszelle *E. Coli* eingeschleust wird. Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, werden in großer Menge gezüchtet und als Suspension aufbereitet. Daraus werden die Plasmide isoliert und aus ihnen die reinen klonierten Gene gewonnen, deren Struktur man über eine Sequenzanalyse überprüfte. Zur Insulinsynthese mußte dieses definitive Gen in der Colizelle mittels RNA exprimiert werden, d.h. Insulin kann nun nach dem Muster der in dem Gen codierten Information synthetisiert werden. Dazu werden die Insulin-produzierenden Colibakterien in Fermentationsprozessen in Massen gezüchtet. Das entstandene Insulin wird von den geweblichen Bestandteilen abgetrennt und komplizierten Reinigungsverfahren unterzogen.

Diese bakterielle Insulingewinnung kann in zwei unterschiedlichen Verfahren ablaufen:

1. Gewinnung von Proinsulin, von dem enzymatisch das Verbindungs (C-) -Peptid abgespalten wird (5).
2. Das zur Zeit vorwiegend angewendete Verfahren beruht auf der getrennten Insertion der Gene für die A- und B-Kette menschlichen Insulins in die Plasmide von *E. coli* (46).

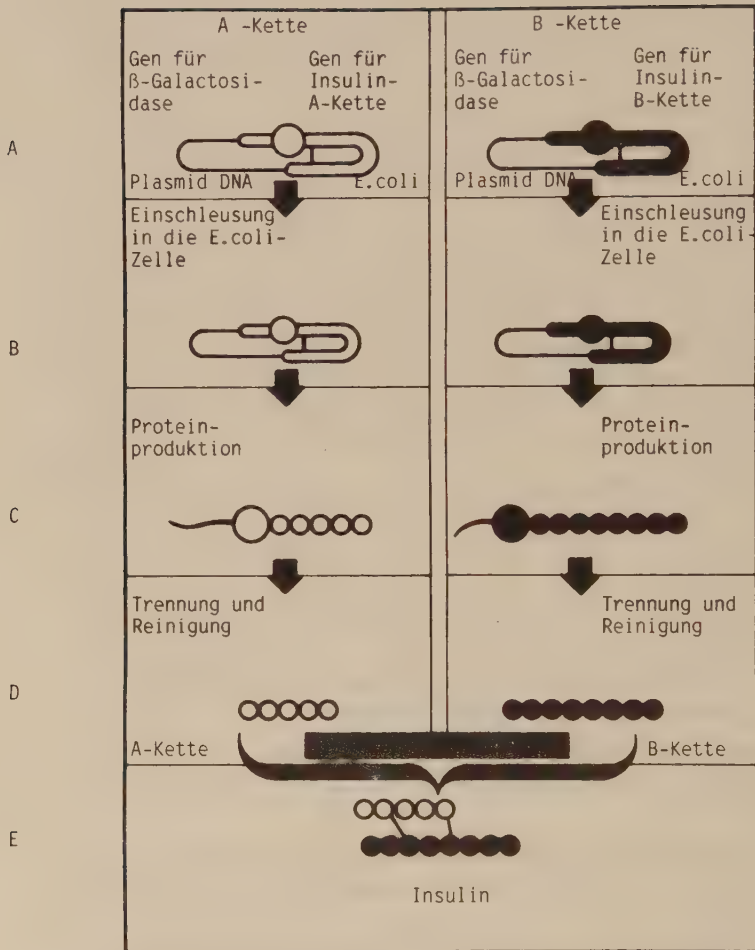


Abb. 3 : Biosynthese von Humaninsulin in Bakterienzellen durch Gentechnologie (63)

Zu Abb. 3:

Die Gene werden über ein Methionincodon an das β -Galaktosidasegen gekoppelt (A) und in die E. coli-Zelle eingeschleust (B). In getrennten Fermentationsansätzen werden auf diese Weise die chimären Proteine der beiden Insulinketten (A- und B-Ketten in Verbindung mit dem Bakterienprotein β -Galaktosidase) synthetisiert (C). Nach Abspaltung der Ketten von der Galaktosidase durch Bromcyan und anschließender Reinigung (D) werden die A- und B-Kette zum Insulinmolekül vereinigt (E). Die Identität von biosynthetischem Humaninsulin mit extrahiertem menschlichen Insulin wurde von Chance et al. (21) u.a. mittels Aminosäure-Analysen, Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Spektralanalyse, Zink-Insulin-Kristallisation sichergestellt. Die Autoren geben einen Reinheitsgrad von mehr als 97 % an.

Die ersten klinischen Studien an gesunden Probanden stammen von Keen et al. (59). Nach s.c.-Injektion von 4.8. I.U. war der Blutzucker-Abfall bei Biosynthetischem Humaninsulin (BHI) etwas stärker als nach Schweineinsulin (PPI), während es nach Applikation einer höheren Dosis (9.6 I.U.) genau umgekehrt war. Nach i.v.-Applikation zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Keen et al. zogen daraus den Schluß, daß möglicherweise bei normalem Metabolismus die hepatische Extraktionsrate von BHI höher als die von PPI ist, und somit BHI eine stärkere Wirkung auf die Leber und eine schwächere in der Peripherie hat.

Ähnliche Ergebnisse bekamen Viberti et al. (136), die bei der niedrigen Dosis s.c. und i.v. von BHI (1.0 I.U./Std.) einen stärkeren Blutzucker-senkenden Effekt, bei der höheren Dosis (1.7 I.U./Std.) einen schwächeren verzeichnen konnten.

Raptis et al. (97) verabreichten BHI gesunden Probanden in der Dosis von 0.05 I.U./kg und 0.1 I.U./kg intravenös.

Bei 120 min. fanden sie für die niedrige Dosis einen signifikant höheren Blutzucker-Wert im Vergleich zu PPI, während das Integral der Blutzucker-Kurve bis 180 min. für PPI größer war. Bei der Dosis von 0.14 I.U./kg ergab sich ein signifikant niedrigerer Blutzucker bei 30 min. und 60 min. post injectionem in der PPI-Gruppe, bei 60 min. in der BHI-Gruppe ohne signifikante Unterschiede in der Integralauswertung der Kurven. Der C-Peptid-Abfall war für BHI (0.05 I.U./kg) signifikant höher, vor allem hinsichtlich der Minima zwischen 30 und 180 min. Auch für hGH fanden Raptis et al. niedrigere Werte in der BHI-Gruppe für diese Dosierung.

Nach s.c.-Applikation von 0.05 I.U./kg Körpergewicht fiel die Blutglucose nach BHI im Vergleich zu Actrapid stärker ab (35). Bei der Dosis von 0.1 I.U./kg s.c. und den i.v. verabreichten Dosen von 0.025 I.U. und 0.05 I.U./kg ergab sich keine Differenz.

Federlin et al. (39) verwendeten in ihrer Studie an gesunden Probanden BHI mit 0.1 I.U./kg s.c. und 0.03 I.U./kg i.v. Während sich bei der i.v.-Gabe kein Unterschied zu ihrem Vergleichsinsulin (PPI) herausstellte, zeigte sich nach s.c.-Gabe eine höhere Seruminsulinkonzentration nach BHI bei 60 min. mit entsprechend tieferen Blutglucosewerten. Auch bei Galloway et al. (43) fanden sich nach s.c.-Injektion von BHI bei Probanden höhere Maxima der Seruminsulinkonzentration (Vergleichsinsulin PPI), die nach i.v.-Applikation nicht auftraten. In einer Publikation von 1981 (44) hatten die gleichen Autoren die Pharmakokinetik von neutral regular und NPH-BHI und NPH-PPI-Präparationen untersucht (44). Dabei zeigte sich bei der i.v.- und s.c.-Anwendung mit 0.1 und 0.15 I.U./kg kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Zeitpunkts und der Ausprägung der maximalen Wirkung, auch nicht zwischen den verschiedenen Dosen.

Eine identische metabolische Aktivität von BHI und PPI an Probanden beschrieben Massi-Benedetti et al. (80). Im Glucose-kontrollierten Insulin-Infusionssystem (GCIIS) untersuchten sie die Wirkung der beiden Insuline (BHI/PPI i.v.) in den Dosen 0.02 I.U./kg/Std., 0.032 I.U./kg/Std. unter Messung des Serum-Insulins, der Blutglucose und des C-Peptids. Die Glucose-Clamping-Technik macht es möglich, die durchschnittliche biologische Aktivität des Insulins ohne die Beeinflussung der Gegenregulationshormone zu bestimmen. Die Glucosemenge, die benötigt wird, um Euglykämie aufrechtzuerhalten, gibt das Maß für die Insulinaktivität wieder. Bottermann et al. (17) verwendeten das gleiche System unter s.c.-Applikation des Insulins, wobei sich die volle biologische Wirksamkeit des BHI bestätigte. Beschrieben wurde eine beschleunigte Resorption des BHI aus dem cutanen Depot und eine entsprechend schnellere Senkung des Blutzucker-Spiegels in der frühen Phase.

Weinges et al. (138) verwendeten den Gerritzen-Test, ein standardisierter Test zur klinischen Beurteilung des Zeit-Aktion-Profiles von Insulin. Die Gegenregulierung des Organismus auf die Hypoglykämie wird durch eine regelmäßige orale Zufuhr von Kohlehydraten unterbunden. Wie schon von anderen Autoren (97, 17) beschrieben, fanden Weinges et al. nur eine etwas schnellere Blutzucker-Senkung nach BHI (s.c.) während der ersten 30 min. und eine langsamere als PPI während der späten Phase. Bei der statistischen Verarbeitung (Varianzanalyse) ergab sich kein Unterschied des hypoglykämischen Effekts der beiden Insuline. In einer weiteren Publikation führten die Autoren (139) Untersuchungen bei Probanden mit regular und NPH-Präparationen von BHI sowie mit verschiedenen Mischkonzentrationen der beiden Insuline durch. Im Gerritzen-Test fanden sie

keine signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden Schweineinsulinen. Es stellte sich lediglich ein etwas schnellerer Wirkungsbeginn mit längerer Dauer des Blutzucker-Minimums nach humanem NPH heraus. Die Blutglucosekurven des regular und des NPH-Humaninsulin lagen während der Anfangsphase näher zusammen als die der entsprechenden Schweineinsuline, während in der späten Phase das regular Humaninsulin weniger mit den NPH-Kurven interferierte.

In den Glucose-Clamp-Versuchen von Schlüter et al. (107) zeigten sich im Seruminsulin, C-Peptid und der Plasma-glucose keine Unterschiede. Der Insulin-induzierte Glucoseverbrauch war auf BHI jedoch signifikant höher als auf PPI. Abweichungen fanden sich auch im hormonellen Spektrum, wo ein Anstieg von Wachstumshormon (hGH) und Serum-Cortisol nach BHI-Applikation ausblieb.

In einer weiteren Studie mit BHI im Vergleich zu PPI mit 0.075 I.U./kg i.v. an Probanden von Rosak et al. (99) ließ sich neben einem stärkeren antilipolytischen und antiketogenen Effekt des humanen Insulins eine signifikante Abweichung in der hormonellen Gegenregulierung feststellen. Während bei gleichen Blutzucker-Spiegeln die Adrenalin- und Glucagon-Sekretion auf BHI geringer war und PRL sich fast nicht stimulieren ließ, war hGH als einzigstes Hormon gestiegen. Subjektiv empfanden die Probanden die Symptomatik der BHI-induzierten Hypoglykämie als weniger gravierend.

Ähnliche Ergebnisse findet man bei Schlüter (111). Bei gleichem Blutzucker-Verhalten nach i.v.-Injektion zweier Dosen BHI/PPI zeigte sich auf BHI ein geringerer Anstieg von Adrenalin, Cortisol und auch hGH, im Gegensatz zur Rosak-Studie (99). Von den abgefragten Hypoglykämiesymptomen ist vor allem das vermehrt ausgeprägte Schwitzen nach PPI-Applikation zu erwähnen.

Petersen et al. (91) fanden neben der verminderten Adrenalinsekretion eine damit möglicherweise korrelierende geringere Hypokaliämie nach BHI (Aktivierung der K^+ - Na^+ -ATP-ase durch Adrenalin, Förderung der Umverteilung des gesamten Körper-Kaliums).

Petersen et al sprachen dabei auch die Neuropathie diabetischer Patienten als interferierenden Faktor hinsichtlich der gegenregulatorischen Adrenalinsekretion während der Hypoglykämie an. Da die Adrenalin-ausschüttung via sympathisches Nervensystem gesteuert wird, können abnorme basale und stimulierte Adrenalin-spiegel aus einer diabetischen Neuropathie resultieren. Diese zusätzlichen Faktoren werfen bei der Beurteilung von BHI in der Anwendung bei diabetischen Patienten mit entsprechender Anamnese verschiedene Fragen auf.

Die folgenden Untersuchungen beziehen sich auf Studien mit BHI bei diabetischen Patienten. Wenn sich auch dabei oft Unterschiede - teilweise mit Signifikanz - herausstellten, so konnten doch die meisten Autoren keine Abweichung im Insulinbedarf und anderen Stoffwechselparametern der untersuchten Diabetiker unter der Therapie mit BHI und den entsprechenden Vergleichsinsulinen verzeichnen (3, 8, 9, 42, 55, 68, 74, 97).

Die Studie von Klier et al. (64) untersuchte die Wirkung von BHI im GCIIS an jugendlichen Typ I-Diabetikern. Es stellte sich ein leicht geringerer Insulinbedarf bei BHI heraus, der sich nicht signifikant verifizieren ließ.

Schlüter et al. (108) machten mit BHI bei Typ I- und Brittle-Diabetikern gute Erfahrungen. Der Insulinbedarf von BHI senkte sich um 15 % zum Vergleichsinsulin. Die Autoren beobachteten bei der Einstellung dieser Patienten mit BHI eine schnellere Remission, wobei als Vergleichskollektiv eine Patientengruppe herangezogen wurde, die mit Schweineinsulin therapiert worden war.

Die Untersucher führten das Ergebnis auf eine reduzierte Inhibition der B-Zell-Sekretion nach BHI-Applikation zurück, wie sie bereits an gesunden Probanden festgestellt hatten (111). Die Patienten ließen sich mit BHI leichter auf euglykämische Werte einstellen. Unter Langzeittherapie schien die Rezeptorempfindlichkeit zuzunehmen. Während hypoglykämischer Phasen zeigten die Patienten eine deutlich mildere Symptomatik. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichte die gleiche Gruppe in einer anderen Publikation von Petersen et al. (92).

Mirouze et al (82) fanden, daß NPH-Humaninsulin bei subcutaner Applikation etwas schneller als die gleiche Insulinpräparation vom Schwein wirkt, wobei sich jedoch kein signifikanter Unterschied herausstellte. Die Blutzucker-Minima lagen bei BHI signifikant tiefer im Vergleich zu PPI. Auch die kontinuierliche Blutzucker-Kontrolle ergab niedrigere postprandiale Werte für BHI.

Untersuchungen an hyperglykämischen, zum Teil ketoazidotischen Patienten von Bachmann et al (3) ergaben unter kontinuierlicher i.v.-Anwendung von BHI keinen signifikanten Unterschied des Insulinbedarfs oder anderer metabolischer Parameter wie z.b. des Serum-Kaliums oder der Flüssigkeitssubstitution zum Vergleichsinsulin vom Schwein. Beyer et al. (8) stellten neben gleichen Blutzucker-Spiegeln (BHI/PPI regular und NPH) und HbA_{1c}-Werten einen leicht zunehmenden Insulinbedarf bei BHI fest, der sich jedoch nicht statistisch verifizieren ließ.

Bei Galloway et al. (42) verkürzte sich die Wirkungszeit von NPH-Humaninsulin im Vergleich zum Schweine-NPH. Die diabetischen Patienten in der Studie von Clark et al. (25) zeigten nach Humaninsulin höhere Blutzucker-Spiegel am Morgen und Abend. Bei vorher mit Schweine-Insulin eingestellten Patienten erhöhte

sich der Bedarf unter BHI, während er bei Patienten, die mit Rinderinsulin vorbehandelt waren, konstant blieb.

1.3. Die Streßreaktion

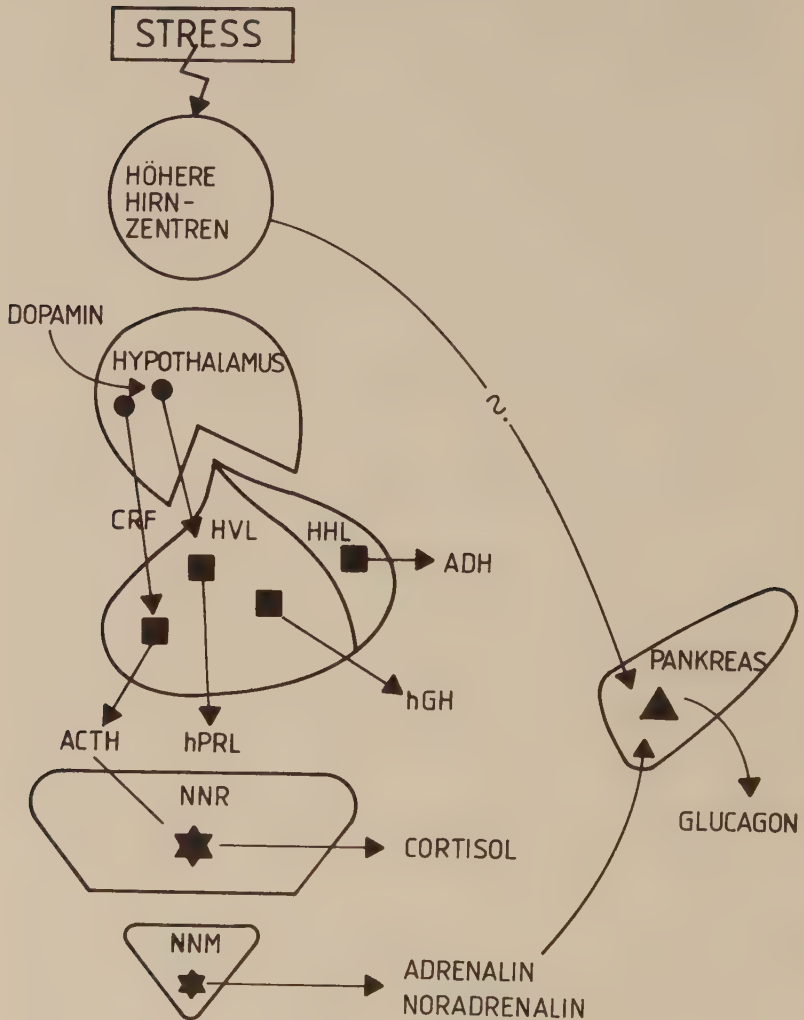


Abb. 4: Auslösung der Streßreaktion und Mechanismen der Gegenregulierung (57)

1.3.1. Die Streßreaktion: Auslösung und Gegenregulierung

Im Streß kommt es zu einer Aktivierung der die HVL-Funktion steuernden hypothalamischen Kernareale. Dem streßinduzierten Anstieg des CRF-Gehalts in der *Emientia medialis* folgt eine vermehrte Sekretion von ACTH und eine via ACTH gesteigerte Ausschüttung von Cortisol aus der Nebennierenrinde. Gleichzeitig werden über den Hypothalamus und das limbische System präganglionäre sympathische Axone erregt, die am Nebennierenmark, einem umgewandelten sympathischen Ganglion, eine gesteigerte Ausschüttung eines Gemisches von ca. 80 % Adrenalin und 20 % Noradrenalin hervorrufen (115). Als Stressoren können alle starken physischen und psychischen Belastungen wirken. Selye (116) beschrieb 1946 das sogenannte Adaptationssyndrom als Antwort des Körpers auf die Belastung. Nach langem oder häufigen Einwirken von Streßreizen wie Traumen, chirurgischen Eingriffen, starke Hitze- oder Kältebelastung, Hypoxie, Schock, Hypoglykämie u.a. reagiert die Nebenniere mit einer Mehrsekretion von Catecholaminen und Nebennierenrinden-Hormonen. Zusätzlich wird die Freisetzung der Hypophysenhinterlappen-Hormone angeregt, die einen Rückgang der Diurese und eine Zunahme des Sympathikotonus auslösen. Der glykogenolytische Effekt des antidiuretischen Hormons (ADH) wurde in einer Untersuchung an Ratten beschrieben (62). Der Mechanismus läuft über die Aktivierung der Glykogenphosphorylase in der Leber, wobei das cyclische Adenosinmonophosphat (C-AMP) keine Rolle zu spielen scheint.

Beim Hypoglykämiestreß liegt der Stimulus für die ACTH-Sekretion in einem Blutzucker-Abfall unter 45 mg/dl. Der Anstieg von ACTH korreliert mit den klinischen Streßsymptomen, wobei für die vermehrte Ausschüttung von Wachstumshormon (hGH) und Prolactin (hPRL) eine Blutzucker-Senkung um 20 % des Ausgangswerts genügt.

Es folgt also hauptsächlich dem Ausmaß der Hypoglykämie.

Eine rasch erzeugte Hypoglykämie löst eine Reihe neuroendokriner Antworten aus, von denen die Glucagonsekretion aus den A-Zellen des Pankreas und die Adrenalinsekretion des Nebennierenmarks den bedeutendsten Anteil einnehmen (29, 30). Während Glucagon hauptsächlich die Glucoseproduktion in der Leber durch Glykogenolyse und Gluconeogenese anregt, ist die adrenerge Gegenregulierung weitaus komplexer. Sie umfaßt eine überwiegend B-adrenerg gesteuerte direkte Wirkung (Steigerung der hepatischen Glucoseproduktion, Hemmung der Glucoseutilisation, sympathische Gegenregulierung) und eine mehr α -adrenerge indirekte Wirkung (Beendigung der Insulinsekretion, Stimulation der Glucagonsekretion).

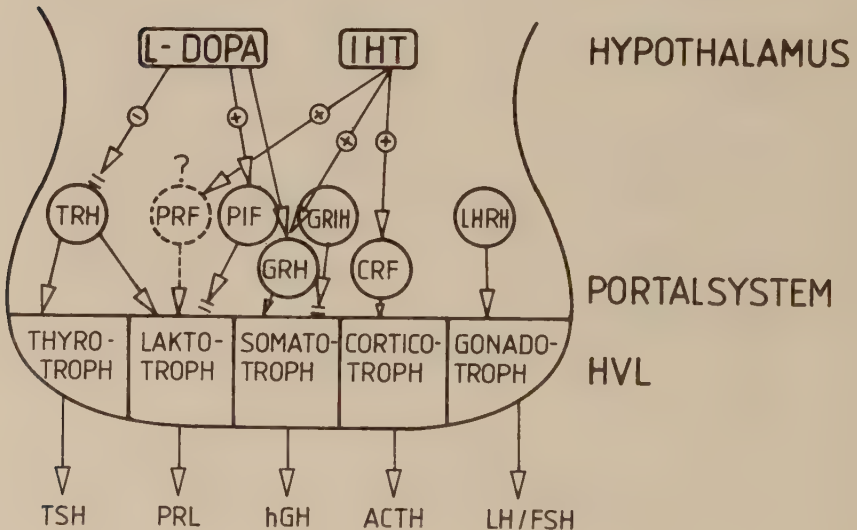


Abb. 5: Schematische Darstellung der Regulation hypophysärer Sekretion (141).

Dem hGH schreibt man eine Hemmung des Glucosetransports ins Gewebe zu und eine - allerdings nur bei chronischer Erhöhung - Entwicklung einer Insulinresistenz.

Auch Cortisol hemmt die periphere Glucoseverwertung. Es wirkt positiv auf die Proteolyse und Gluconeogenese. Die Bedeutung dieser beiden gegenregulierenden Hormone ist aber eher von untergeordnetem Wert.

Humanes Prolactin ist in 16 % seiner Aminosäuren dem hGH homolog. In Stresssituationen scheint es jedoch sensibler als hGH zu reagieren (137, 85).

Im Gegensatz zu den anderen HVL-Hormonen wird die Sekretion von hPRL überwiegend inhibitorisch geregelt. Im basalen Teil des Hypothalamus wird unter Einfluß des Neurotransmitters Dopamin ein PRL-inhibiting-factor abgegeben, der über die hypophysären Portalgefäße zu den PRL-produzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens gelangt und dort die Synthese drosselt (98).

Die Bedeutung des PRL als diabetogenes Hormon beschrieben Landgraf et al. (71). Sie konnten bei Patienten mit PRL-produzierenden Hypophysentumoren eine verminderte Glucosetoleranz mit Hyperinsulinämie feststellen. Die Basalwerte der Blutglucose und des Seruminsulins hatten keine Differenz zu einer altersentsprechenden Kontrollgruppe aufgewiesen.

Die endokrinologische Diagnostik dient neben dem Nachweis hypophysärer Partialausfälle auch der Lokalisation eines hypophysären Prozesses. Durch Etagediagnostik läßt sich feststellen, ob der Defekt in der peripheren Drüse (im Falle glandotroper Hormonausfälle), in der Hypophyse oder im Hypothalamus zu suchen ist (47, 115, 142). Ferner läßt sich der Erfolg therapeutischer Maßnahmen (Substitutionstherapie oder operative Therapie bei Hormonexzeß) objektivieren.

Für die klinische Praxis hat es sich bewährt, die Hypophysenvorderlappen-Funktion durch kombinierte Gabe von Thyreotropem Hormon (TRH), luteinisierendem Hormon (LH-RH) und ACTH zu prüfen (142). Mit diesem sogenannten "Hypophysen-Cocktail" können alle Partialfunktionen erfaßt werden.

Der IHT ist darüber hinaus ein Kriterium zur Beurteilung der Streßfähigkeit (s.S.37).

1.3.2. Hypoglykämie - Streß

Eine Hypoglykämie löst in der Regel eine prompte Freisetzung gegenregulatorischer Hormone aus, wie z.B. Glucagon, ACTH, Cortisol, Wachstumshormon (hGH), Prolactin (hPRL), Catecholamine und antidiuretisches Hormon (ADH).

Das Ausmaß bzw. die Symptomatik einer Hypoglykämie läßt Schlüsse auf die Geschwindigkeit des Blutzuckerabfalls zu, d.h. ein allmählicher Abfall des Glucosespiegels im Blut kann die Symptomatik sehr diskret halten oder sogar fehlen lassen.

Vom organischen Hyperinsulinismus abgesehen wird ein rascher Abfall des Blutzucker-Spiegels auf Werte unter 40 mg/dl in der Regel nur iatrogen erreicht (relative oder absolute Überdosierung von Insulin oder Sulfonylharnstoffderivaten).

Der Körper reagiert auf den Hypoglykämiestreß mit einem erhöhten Parasympathikotonus, der sich u.a. in Heißhunger, Übelkeit, Schwäche, Erbrechen zeigen kann. Häufige Zeichen der sympathischen Gegenregulation sind Tremor, Tachykardie, Herzpalpitationen, Hypertonus, Schwitzen, Kopfschmerzen.

Wird die Hypoglykämie nicht ausreichend abgefangen, treten schließlich zentralnervöse Störungen, wie z.B. Ermüdbarkeit, Verwirrheitszustände, Koordinationsstörun-

gen, Lethargie, Somnolenz, Konvulsionen, fokale Zeichen (z.B. Aphasien, akustische Halluzinationen), oder ein Koma auf. Da das Gehirn fast ausschließlich Glucose verbrennt und keine ausreichenden Glycogenreserven besitzt, ist es gegenüber Glucosemangel außerordentlich empfindlich. Der mit der Blutzuckersenkung verbundene Abfall der zerebralen Sauerstoffaufnahme entspricht als pathophysiologisches Korrelat den beschriebenen zentralen Ausfällen.

Beim Insulin-Hypoglykämietest (IHT, S. 37 f.) bedient man sich dieser Streßreaktion, um diagnostische Aussagen über die Funktion Hypothalamus-Hypophyse und der abhängigen "Achsen" machen zu können. Hierzu wird der Patient mit einer Bolusinjektion von ca. 0.15 I.U./kg Körpergewicht Insulin i.v. belastet, wobei sein Blutzucker nach spätestens 45 min. auf mindestens 40 mg/dl abgefallen sein sollte.

2. Thema der Arbeit

Bis vor kurzem verwendete man für die Therapie des Insulin-pflichtigen Diabetes mellitus sowie zur Provokation einer Hypoglykämie im Rahmen diagnostischer Tests ausschließlich Rinder- und Schweineinsulin. Mit der Verfügbarkeit von semisynthetischem und biosynthetischem Humaninsulin für den klinischen Gebrauch stellte sich die Frage, inwieweit diese neuen Insuline den herkömmlichen Präparationen überlegen sind (92, 94, 121).

Einige Arbeiten (99, 110) beschrieben eine unterschiedliche Freisetzung einiger gegenregulatorischer Hormone auf eine Insulin-induzierte Hypoglykämie sowie eine subjektiv geringer ausgeprägte Symptomatik nach Applikation von Humaninsulin im Vergleich zu Schweineinsulin.

Diese Beobachtungen könnten vor allem für Patienten, deren Fähigkeit zur Gegenregulierung durch Medikamenteneinnahme (z.B. B-Rezeptoren-Blocker) oder durch eine autonome Neuropathie eingeschränkt ist, klinisch relevant werden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Kurzzeitwirkung von Schweine- und Humaninsulin auf den Blutzuckerspiegel, der Freisetzung von Streßhormonen und der subjektiven Zeichen der Hypoglykämie. Eine Gruppe freiwilliger Probanden wurde mit zwei verschiedenen Konzentrationen der beiden Insuline belastet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte im intraindividuellen Vergleich. Interindividuell verglichen wurden außerdem zwei Gruppen von Patienten mit hypophysären Erkrankungen, die entweder Schweine- oder Humaninsulin erhalten hatten.

3. Methodik

3.1. Personen/Material

Die Studie wurde mit biosynthetischem Humaninsulin (Biosynthetic Human Insulin (BHI), Lilly CT 4969 1 B, 40 I.U./ml) und hochgereinigtem Schweineinsulin (Purified Pork Insulin (PPI), Lilly CT 4970 0A, 40 I.U./ml) als Vergleichsinsulin durchgeführt.

Es nahmen acht gesunde Probanden (vier weibliche und vier männliche) mit einem Alter von 24 ± 0.6 Jahren und einem Idealgewicht nach Broca von 84 ± 3.3 % (jeweils Mittelwert und SEM), die keine Medikamente eingenommen hatten, daran teil.

Zusätzlich umfaßte die Studie 16 Patienten, die sich im Rahmen einer Abklärung einer hypophysären Erkrankung dem Insulinhypoglykämietest (s.S.37 ff) unterzogen. Allen Personen wurde der Testverlauf erklärt. Sie gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Patienten und Ver-

suchspersonen wurden eng überwacht, alle Beschwerden und Symptome des Testes notiert. Darüber hinaus mußten die Patienten nach Beendigung des Testes alle Symptome, die bei einer Hypoglykämie auftreten können, auf Befragung mit ja oder nein beantworten.

Vor der systemischen Insulinanwendung führte man bei allen Personen zum Ausschluß allergischer Reaktionen einen Hauttest (s.S. 33 und S. 46) durch. Die acht gesunden Probanden erhielten alle BHI und PPI ($0.125 \text{ I.U./kg} \pm 0.003$) in einem Intervall von 1 - 2 Wochen; sechs von ihnen unterzogen sich 6 - 8 Monate später einer weiteren Testreihe mit einer niedrigeren Dosierung der beiden Insuline (0.075 I.U./kg). Die Reihenfolge der Human- bzw. Schweineinsulinapplikation wurde zufällig im einfachen Blindversuch gewählt.

Die 16 Patienten wurden randomisiert einer der beiden Gruppen zugeteilt. Acht Patienten applizierte man Humaninsulin (BHI-Kollektiv, Alter 33.4 ± 4.7 Jahre, Gewicht nach Broca $121.5 \% \pm 8.8$) und acht erhielten Schweineinsulin (PPI-Kollektiv, Alter 45 ± 5 Jahre, Gewicht nach Broca $121 \pm 4 \%$). Die genauen klinischen Daten sind in den Tabellen 3 - 5 auf Seite 30 ff. aufgeführt.

Am Tag vor dem IHT wurde ein oraler Glucose-Toleranz-Test (OGTT) durchgeführt, um anhand der Glucosetoleranz eine individuelle Dosisfindung vorzunehmen, nach der eine adäquate Testung der hypothalamisch-hypophysär-peripheren Achse gewährleistet war. Die Voraussetzung war ein Absinken der Blutglucose unter 40 mg/dl .

Es ergab sich für die BHI-Gruppe eine Dosis zwischen 0.15 und 0.18 I.U./kg , für die PPI-Gruppe zwischen 0.12 und 0.17 I.U./kg Körpergewicht.

Das Ergebnis des Oralen Glucose-Toleranztestes (OGTT) differierte nicht signifikant zwischen beiden Kollektiven (Tab. 7).

Proband		Größe in cm	Gewicht in kg % Broca Soll *		Alter in Jahren	Insulin- Dosis in I.U./kg
Geschl.						
S.P.	w	172	55	85	24	0.12
P.R.	m	192	92	111	24	0.14
B.S.	w	167	56	93	24	0.12
J.H.	m	178	63	90	25	0.12
R.R.	m	178	75	107	27	0.14
S.K.	w	165	52	89	21	0.12
T.L.	m	178	71	101	24	0.12
S.S.	w	180	68	94	23	0.12

* Sollgewicht nach Broca (in kg):

Betrag der Körpergröße (in cm) - 100,
abzüglich 10 %

Tab. 2. Probandengruppe

Patient	Geschlecht	Alter in J.	Größe in cm	Gewicht in kg Broca- Sollg.	Insulin- dosis (BHI) I.U./kg KG	Diagnose	Visus- minde- rung	Hypophysen- funktion	Therapie	
R.W.	w	38	168	50	82	0.15	Prolactinom	-	4	Bromocriptin
B.G.	w	16	168	54	88	0.15	Prolactinom	-	4	Bromocriptin
B.T.	w	32	163	82	145	0.18	p.o.Kontrolle epitheloidzell. Adenom	-	4, 5	Bromocriptin L-Thyroxin
M.B.	w	18	167	67	111	0.18	p.o.Kontrolle Prolactinom	-	5	L-Thyroxin
C.B.	m	23	181	100	137	0.18	p.o.Kontrolle inakt.Adenom	-	2, 3, 5, 6	L-Thyroxin Desmopressin- diacetat
H.P.	m	50	174	91	137	0.18	Rezidiv inakt.Adenom	+	2	Testosteron- propionat
N.O.	m	49	172	84	130	0.16	p.o.Kontrolle inakt.Adenom	+	2, 3	Testosteron- propionat
G.R.	m	41	173	93	142	0.17	Prolactinom	-	2, 3, 4	Testosteron- propionat Bromocriptin
$\bar{x}$		33,4		77,6	121,5	0.17				
S.E.M.		4,7		6,6	8,8	0.01				
1 Cortisol, 2 Gonadotropine, 3 hGH, 4 PRL, 5 Hypothyreose, 6 Diabetes Insipidus										

1 Cortisol↓, 2 Gonadotropine↓, 3 hGH↓, 4 PRL↑, 5 Hypothyreose, 6 Diabetes Insipidus

Tab. 3: Patientengruppe P1 (Applikation von biosynthetischem Humaninsulin)

Patient	Geschlecht	Alter in J.	Größe in cm	Gewicht in kg Broca- Solig.	Insulin- dosis (PPI) I.U./kg KG	Diagnose	Visus- minde- rung	Hypophysen- funktion	Therapie
W.G.	m	53	168	70	113	0.16	Prolactinom	-	1, 4, 5 Bromocriptin Hydrocortison L-Thyroxin Testosteron- propionat
S.Z.	m	51	176	78	113	0.12	inakt. Adenom	+	1, 3, 5, 6 Testosteron- propionat L-Thyroxin Desmopressin- diacetat
W.J.	m	45	172	91	140	0.15	p.o. Kontrolle inakt. Adenom	-	2, 3 Testosteron- propionat
P.S.	m	45	168	79	130	0.15	Prolactinom	-	4 Bromocriptin
E.M.	w	53	157	52	102	0.15	p.o. Kontrolle inakt. Adenom	+	1 Hydrocortison
F.F.	m	61	175	90	134	0.17	p.o. Kontrolle inakt. Adenom	-	
N.R.	w	21	161	64	116	0.16	Prolactinom	-	1, 3, 4 Hydrocortison
J.D.	w	27	155	59	118	0.15	Prolactinom	-	4 Bromocriptin

$\bar{x}$	45	73	121	0.15
S.E.M.	50	50	44	0.01

1 Cortisol↓, 2 Gonadotropine↓, 3 hGH↓, 4 PRL↑, 5 Hypothyreose, 6 Diabetes Insipidus

Tab. 4: Patientengruppe P 2 (Applikation von hochgereinigtem Schweineinsulin)

3. 2. Protokoll

3. 2. 1. Intracutane Testung von BHI

Alle Probanden und Patienten der BHI-Gruppe wurden vor dem IHT hinsichtlich ihrer Hautreaktion auf BHI getestet. Dazu setzte man ihnen am Unterarm vier intracutane Quaddeln mit je 50 ul einer BHI-Verdünnung steigender Konzentration und eine Quaddel mit der Lösung, in der die Insuline gelöst waren.

	Substanz Konzentration BHI (I.U./ml)	I.U./50 ul
A	BHI 0.02	0.001
B	BHI 0.2	0.01
C	BHI 2.0	0.1
D	BHI 20.0	1.0
E	Verdünnungslösung	-

Tab. 5: Verwendete Insulinkonzentrationen (BHI) bei der intracutanen Testung.

Die Reaktion wurde sofort, nach 20 min., nach 6 Std. und nach 24 Std. abgelesen und wie folgt beurteilt:

- Ø keine Rötung, keine Quaddel, kein Juckreiz
= keine Reaktion
- (+) leichte Rötung, keine Quaddel, Juckreiz
= leichte Reaktion
- + Rötung, Quaddel bis 1 cm Durchmesser, Juckreiz
= deutliche Reaktion
- ++ Rötung, Quaddel über 1 cm Durchmesser, Juckreiz
= starke Reaktion

3.2.2. Oraler Glucose-Toleranztest (OGTT)

Der orale Glucose-Toleranztest ist ein standardisierter Test zur Überprüfung des Glucosestoffwechsels.

An drei dem Test vorhergehenden Tagen sollte der Patient eine kohlenhydratreiche Mischkost zu sich nehmen und eine Nacht vorher fasten.

Nach Bestimmung des Nüchtern-Blutzuckers um 9 Uhr morgens beginnt der Test mit Einnahme eines Oligosacharid-Gemisches (Dextro-OGT^R, Firma Boehringer). 400 ml Dextro-OGT^R, entsprechend 100 g Glucose, werden innerhalb von 3 - 4 min. getrunken. Die Blutproben werden kapillär aus der Fingerbeere zu den Zeitpunkten 30 - 60 - 120 - 180 min. entnommen.

(50 μ l Blut in Gefäßen mit 500 μ l Perchlorsäure).

Die Blutglucose wird aus dem deproteinisierten Blut nach der Hexokinase-Methode von Boehringer bestimmt. Die Auswertung der Untersuchung erfolgte nach den Kriterien der WHO (144).

3.2.3. Insulinhypoglykämietest (IHT)

Die Indikation des Tests liegt in der endokrinologischen Diagnostik hypothalamisch-hypophysärer Erkrankungen. Er wird eingesetzt zur Überprüfung der Streßfähigkeit mit Messung von Streßhormonen, wie ACTH, Cortisol, hGH und hPRL.

Die zu untersuchenden Probanden sollten nüchtern sein, möglichst keine Medikamente einnehmen und an keiner Krankheit leiden, die eine Kontraindikation des Tests darstellt, wie z.B. Cerebrales Anfallsleiden, KHE.

Als Störfaktoren des Tests wirken sich Glucocorticoide, Hydrocortison, β -Blocker, Dopaminantagonisten (Phenothiazine), Serotoninantagonisten (Cyproheptadiene) aus.

3.2.3.1. IHT-Vorbereitung

0.9 %ige NaCl-Infusion, 500 ml

i.v.-Braunüle

Insulin	Purified Pork Insulin (PPI) (Lilly CT 4970 OA 40IU/U)
---------	--

bzw. Biosynthetic Human Insulin (BHI) von Lilly-Pharma
(Lilly CT 4969 1 B, 40 IU/ml)

Glucoselösung (50 %), 100 ml, davon 2 x 20 ml aufgezogen

Material zur Probennahme

Blutglucose - Eppendorf-Gefäße mit 500 µl Perchlorsäure (0.33M)
- BZ-Kapillaren (50 µl)
- YSI-Gerät zur BZ-Sofortbestimmung (Mode 23 A, Yellow Springs Instruments, Ohio)

Das Material für die folgenden Hormone wird in einem Eisbehälter gelagert.

Glucagon - Röhrchen (10 ml) mit 5 µl Aprotinin Konzentration (100 mg/ml), 50 µl Heparin (5 I.U./ml), (Novo, Copenhagen)

ACTH - Polystyrol-Röhrchen (10 ml, EDTA-beschichtet
einer Konzentration von ca. 1 mg/ml Blut) mit 200 µl
Trasylol® (Bayer) (≅ 4000 I.U. Aprotinin)

Catecholamine - Eppendorf-Gefäße mit 40 µl Stabilisator
(Plasmaadditive: Titriplex VI, Merck 8435
(95 mg/ml)
Glutathion red.
(60 mg/ml)

- Eppendorf-Zentrifuge und -Gefäße

Für die restliche Hormonanalytik

- Routine-Röhrchen (20 ml) zur Serumgewinnung

- Insulin

- C-Peptid

- Cortisol

- hGH

- hPRL

3.2.3.2. Durchführung des IHT

Um einen genauen Verlauf des Hormonprofils zu erhalten, wurde der üblich verwendete Test hinsichtlich der Abnahmezeiten, der Testdauer und des umfassenden Hormonspektrums modifiziert.

Die Testpersonen waren 12 Stunden vorher nüchtern und hatten nicht geraucht. Unter Grundumsatzbedingungen wurde um 9 Uhr morgens ein i.v.-Zugang in eine Cubitalvene gelegt und nach Abnahme der ersten Blutprobe (-15' Wert) eine Infusion (NaCl 0.9 %) angehängt. Nach 15 Minuten wurde die Probe 0' abgenommen und die entsprechende Insulindosis (siehe Probanden- bzw. Patientenkollektiv i.v.) injiziert. Die Entnahme weiterer Blutproben folgte zum Zeitpunkt 10', 15', 20', 30', 45', 60', 75', 90' und 120', wobei die Werte 10', 20' und 75' beim Patientenkollektiv entfielen.

Bei jeder Abnahme erfolgte zur optimalen Überwachung des Testverlaufs eine Blutzucker-Sofortbestimmung am YSI (Yellow Springs Instruments).

Eine weitere Probe wurde zur Blutzucker-Bestimmung im Labor vorbereitet.

Für die Catecholaminanalytik wurde 1 ml Blut in das vorbereitete Gefäß pipettiert und innerhalb 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß pipettiert und auf Eis gestellt. Zur Glucagon- bzw. ACTH-Bestimmung wurden 5 bzw. 8 ml in die auf Eis gestellten Röhrchen aufgefangen.

Für die restliche Hormonanalytik diente ein Serumröhrchen mit ca. 15 ml Blut.

Im Anschluß an den Test wurden die Blutproben bei 4 ° zentrifugiert, das Plasma bzw. Serum abpipettiert und bis zur Analytik bei - 80 ° tiefgefroren.

Die subjektiven Hypoglykämie-Symptome wurden nach bestimmten Parametern während der gesamten Testdauer

aufgezeichnet und ausgewertet (s. S. 47 ff).

Bei keinem Test war die hypoglykämische Reaktion so stark, daß mit Glucosegabe unterbrochen werden mußte.

3. 3. ANALYTIK

3.3.1. Blutglucose

Die Sofortbestimmung der Blutglucose während des Tests wurde am YSI-Gerät (Yellow Springs Instruments) durchgeführt. Simultan abgenommene Blutproben wurden nach Fällung mit Perchlorsäure (0.33 M) mit der spezifischen Hexokinase-Methode, Boehringer Mannheim, bestimmt.

3.3.2. Kalium

Das Serum-Kalium wurde flammenphotometrisch am Gerät Corning 460 automatic flame (IMA Analysengeräte) bestimmt.

3.3.3. Insulin

Die Insulinbestimmung erfolgte nach der von Hales und Randle 1963 publizierten Doppel-Antikörper-Methode (50). Mit einem Humaninsulin-Standard der Firma Wellcome (RD 13, Ch 9694) wurde eine Eichkurve mit den Konzentrationen 0 - 6.25 - 12.5 - 25 - 50 - 75 - 100 - 200 $\mu\text{U/ml}$ (Verdünnungsmedium Sorinpuffer 0.06 M, PH 7.4) erstellt, die zur Berechnung der Insulinkonzentration der eingesetzten Proben diente.

Der Doppel-Antikörper (Insulin Binding Reagent RD 12, Firma Wellcome) bestand aus einem Antikörper gegen Humaninsulin vom Meerschweinchen und einem zweiten Anti-

körper gegen Meerschweinchen-Globulin vom Kaninchen. Als Tracer wurde hochgereinigtes mit 125 Jod-markiertes Rinderinsulin (Behring-Werke AG, Marburg) verwendet.

Die Trennung von freiem und Antikörper-gebundenem Insulin erfolgte nach der semiautomatischen Mikrofiltrationsmethode über Zelluloseacetatfilter (16).

Nach Bestimmung der Radioaktivität der eingesetzten Proben im 80 000 γ -Counter von LKB wurde die den jeweiligen Zählraten entsprechende Insulinkonzentration mit der Spline-Approximation nach Marschner et al. (79) berechnet. Der 50 % - Intercept des Assays belief sich auf 53 μ U/ml. Die Variationskoeffizienten für den sehr niedrigen Bereich waren 54 %, für den mittleren und hohen Bereich jeweils 10 %.

3.3.4. C-Peptid

C-Peptid wurde im C-Peptid-RIA 100 von I.R.E. von Fleurus, Belgien, gemessen. Das Prinzip des Tests beruht auf der kompetitiven Bindung von 125 Jod-markiertem C-Peptid (Tracer) und des zu bestimmenden Serum-C-Peptids an den Antikörper. Die Eichkurve wurde mit Standardkonzentrationen von 0 - 15 ng/ml erstellt.

Die mit Tracer inkubierten Proben wurden mit einer Immunoabsorbent-Lösung versetzt und aufgetrennt, wobei die gebundene Radioaktivität später im LKB-Counter gemessen werden konnte.

Der Intraassay-VK des Testes lag bei 3,2 %, der Interassay-VK bei 10 %.

3.3.5. Glucagon

Die radioimmunologische Bestimmungsmethode für Glucagon basiert auf der Methode von Heding (51). Es wurde der "RIA-Kit for Pancreatic Glucagon" von Novo Research Institute verwendet, der einen hochgereinigten Glucagon-Standard vom Schwein, 125 Jod-markiertes Schweineglucagon als Tracer und einen Antikörper gegen Schweineglucagon vom Kaninchen (K 5563) enthielt.

5 ml Blut wurden in ein eisgekühltes Probenröhrchen mit 5 μ l Aprotinin (100 mg/ml) und 50 μ l Heparin (5 I.U./ml) gefüllt und nach Abkühlen bei 4 ° C zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde bis zur Weiterverarbeitung bei - 80 ° C tiefgefroren.

Vor Einsatz der Probe in den RIA mußte eine Extraktion mit 96 %igem reinen Äthanol durchgeführt werden (auf 1 ml Plasma 1.8 ml 96 %iger Äthanol). Nach Zentrifugation des Gemisches bei 2000 g für 10 min. dekantierte man den Überstand in ein Gefäß. Das Präzipitat wurde mit einer Lösung aus Äthanol und Phosphatpuffer ausgewaschen, zentrifugiert und zu dem bereits gewonnenen Überstand dekantiert. Diese Lösung trocknete man im Exsikkator bei Raumtemperatur über 18 Std. unter einem Druck von 10 mm Hg. Der aufbereitete Extrakt wurde in einem Phosphatpuffer gelöst und zur radioimmunologischen Bestimmung eingesetzt. Dazu wurden je 100 μ l Glucagonstandard einer Konzentration von 0 - 0.7 ng/ml bzw. die unbekannten Proben in Dreifachwerten mit je 100 μ l Antiserum (Antikörper gegen Schweineglucagon K 5563) versetzt und nach Mischen für 24 Stunden bei 4 ° C inkubiert. Nach Zugabe des Tracers erfolgte eine weitere Inkubation (24 Std. bei 4 ° C). Diesen Ansätzen wurde je 1.6 ml reiner Äthanol zugesetzt. Nach Zentrifugation (10 min. bei 2000 g) wurde aus den Überständen die Aktivität ermittelt (80000 γ -Counter von LKB).

Die Konzentration der eingesetzten Proben bestimmte man anhand der Standardkurve.

Für den 50 % - Intercept des Assays ergab sich 211 pg/ml. Die Variationskoeffizienten waren 1.7 % (Intraassay-VK) bzw. 17 % (Interassay-VK).

3.5.6. WACHSTUMSHORMON

hGH wurde in einem Kurz-RIA bestimmt, einer Modifikation der von WERDER beschriebenen Doppel-Antikörpermethode (140).

Ohne Vorinkubation erfolgte die Tracer-Inkubation mit dem 1. Antikörper bei 4 ° über 16 Stunden. Nach Zugabe des 2. Antikörpers wurde 90 - 120 min. bei Zimmertemperatur inkubiert, 15 min. bei 20 ° mit 4000 g zentrifugiert und nach Absaugen des Überstands im γ -Counter gezählt.

Die untere Nachweisgrenze lag bei 3.34 ± 1.8 ng/ml. Der 50 % - Intercept betrug 38.9 ± 8.6 ng/ml. Als Interassay-VK ergab sich 20 %, als Intraassay-VK 15 %.

Mit hPRL bestand eine Kreuzreaktion von 3 %.

3.5.7. PROLACTIN

Die hPRL-Bestimmung erfolgte - als Kurz-RIA vereinfacht - nach der bei SINHA et al. (120) beschriebenen und von WERDER (140) modifizierten Doppel-Antikörpermethode. Als Referenz-Präparation diente MRC 75/504.

Im RIA wurde Antiserum vom Kaninchen und 125 Jod-hPRL eingesetzt.

3.3.8. ACTH

Die ACTH-Bestimmung erfolgte nach der Methode von MÜLLER et al. (83).

Die Blutprobe war in vorbereiteten Röhrchen (s. IHT S. 36) sofort gekühlt, bei 4 ° zentrifugiert und bei - 80 ° tiefgefroren worden. Aus dieser Plasmaprobe wurde ACTH mit Kieselgel extrahiert (Ausbeute 75 %, VK 2 %) und radioimmunologisch bestimmt.

Die untere Nachweisgrenze lag bei 2 - 10 pg/ml. Der Interassay-VK wurde mit 18.5 %, der Intraassay-VK mit 6.4 % angegeben. Der günstigste Bereich des Präzisionsprofils deckte sich mit dem 50 %-Intercept.

Der Assay ist streng N-terminal, gegen das Antigen 1/24, das an Thyreoglobulin von Kaninchen gekoppelt ist, gerichtet.

3.3.9. Cortisol

Das Serum-Cortisol wurde nach der Methode von STALLA et al. (126) bestimmt.

Der Assay erlaubt eine direkte radioimmunologische Bestimmung von Cortisol bei pH 4 ohne Extraktion oder Hitzedenaturierung.

Der Mittelwert (Abnahme 9 Uhr morgens) lag bei 14.3 ± 5.5 ug/dl. Als Qualitätskontrollgrößen fanden sich ein Interassay-VK von 10.5 % und ein Intraassay-VK im steilen - für klinische Fragestellungen relevanten - Bereich der Standardkurve von weniger als 5 %. Mit Cortison besteht eine Kreuzreaktivität von 85 %.

3.3.10 CATECHOLAMINE

Die Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin wurden nach der Methode von PEULER und GARLAND (95) bestimmt. Diese Modifikation der Originalmethode nach PASSON und PEULER (90) erlaubt die direkte und gleichzeitige Bestimmung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin in Plasmaproben ohne vorhergehende Extraktion der Catecholamine oder Deproteinierung.

Die Empfindlichkeit reicht bis zu einer Adrenalin- bzw. Noradrenalinkonzentration von 20 pg/ml.

Das Prinzip des Tests beruht auf der Katalyse durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Die Auftrennung der ^3H -Methylcatecholamine erfolgt mit großer Spezifität über eine Dünnschichtchromatographie.

Die Werte des Interassay-VK betrugen für Adrenalin 9.4 % und Noradrenalin 10.3 %. Intraassay-Koeffizienten ergaben sich bis zu 7 %, im Durchschnitt 3.1 % für Adrenalin und 3.5 % für Noradrenalin.

3.4. Berechnungen und statistische Methoden

Die Daten erscheinen als Mittelwerte $\pm$ SEM der jeweiligen Kollektive und bilden die Grundlage der gezeichneten Kurven. Darüber hinaus wurden die Integrale der Kurven errechnet (Area under the curve oder AUC).

$$\sum_{n=1}^{n=N-1} \frac{(X_{u+1} - X_u) (Y_{n+1} + Y_u)}{2}$$

Formel zur Berechnung der AUC

Die Maxima der Meßwerte jedes Probanden oder Patienten für Insulin, Glucagon, Cortisol, Catecholamine, hGH, hPRL, ACTH und die Minima für Glucose, C-Peptid und Kalium wurden zusätzlich ermittelt.

Um den Einfluß der verschiedenen Nullwerte der unterschiedlichen Probanden bzw. Patienten auszuschließen, wurde der absolute Anstieg bzw. Abfall der gemessenen Parameter errechnet, indem man den Nullwert vom Maximum bzw. vom Minimum den Nullwert jeder Versuchsperson subtrahierte und diese Einzelwerte mittelte. Dieser Anstieg bzw. Abfall wurde in % des Nullwerts ausgedrückt,

$$\text{d.h. Prozentualer Anstieg} = \frac{\text{Maximum} - \text{Nullwert}}{\text{Nullwert}} \times 100$$

$$\text{Prozentualer Abfall} = \frac{\text{Nullwert} - \text{Minimum}}{\text{Nullwert}} \times 100$$

Da sich der Zeitpunkt der maximalen bzw. minimalen Konzentration des jeweiligen Substrats bzw. Hormons nicht bei allen Probanden deckte, wurden die oben bereits erwähnten individuellen Minima bzw. Maxima errechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte im Wilcoxon's Test und/oder Student's T-Test für gepaarte Proben für die Probandengruppe, für ungepaarte Proben für die Patientengruppe.

Eine Übersicht zeigt noch einmal die Aufarbeitung der Untersuchungsergebnisse:

1. Mittelung der analysierten Werte eines jeden Kollektivs mit Errechnung der mittleren Abweichung ergibt die Daten für die Mittelwertskurven.

2. Integrierte Fläche unter der Mittelwertskurve (AUC)
3. Berechnung der Maxima bzw. Minima der einzelnen Versuchsperson mit anschließender Mittelwertsberechnung dieser Daten.
4. Absoluter Hormonanstieg bzw. -abfall nach der Formel:
Maximum - Nullwert bzw. Nullwert - Minimum
5. Relativer Anstieg bzw. Abfall nach der Formel:

$$\frac{\text{Maximum} - \text{Nullwert}}{\text{Nullwert}} \times 100 \text{ bzw. } \frac{\text{Nullwert} - \text{Minimum}}{\text{Nullwert}} \times 100$$

4. ERGEBNISSE

4.1. Intracutaner Test mit BHI

Das Ergebnis der Teste ist in Tabelle 6 zusammengefaßt. Bei sechs Patienten war eine leichte Reaktion sofort und nach 20 min. auf die verschiedenen BHI-Konzentrationen zu verzeichnen, die spätestens nach 6 Stunden wieder verschwunden war. Eine deutlich ablesbare Hautreaktion konnte nur nach Injektion des reinen Lösungsmittels beobachtet werden, das nach großer Wahrscheinlichkeit auch für die bereits angesprochenen Reaktionen verantwortlich war.

Reaktion	Zeitpunkt der Testablesung	
	sofort	20 min. nach Injektion
keine Reaktion Ø	7 Pat.bei A,B,C 6 Pat.bei D 3 Pat.bei E	1 Pat.bei A,B,C,D,E
leichte Reaktion (+)	1 Pat.bei A,B,C 2 Pat.bei D 3 Pat.bei E	6 Pat.bei A,B,C,D
deutliche Reaktion +	2 Pat.bei E	1 Pat.bei A,B,C,D 5 Pat.bei E
starke Reaktion ++	-	2 Pat.bei E

Tab.6: Intracutaner Test mit BHI (Patientenzahl n = 8)

Verwendete Konzentrationen von BHI: A 0.02 I.U./ml

B 0.2 I.U./ml

C 2.0 I.U./ml

D 20.0 I.U./ml

E. Verdünnungslösung

4.2. ERGEBNIS DES ORALEN GLUCOSETOLERANZTESTS (OGTT) BEI PATIENTEN MIT HYPOPHYSÄREN STÖRUNGEN

Angabe des Mittelwerts der Blutglucose (mg/dl) $\pm$ S.E.M. der Patientengruppe, deren IHT mit Schweineinsulin (n = 8), sowie der Patientengruppe, deren IHT mit biosynthetischem Humaninsulin (n = 8) durchgeführt wurde. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Blutglucoseverhalten nach OGTT in beiden Patientenkollektiven.

Zeit in min.	Blutglucose (mg/dl)	
	Schweineinsulin	Humaninsulin
0	107 $\pm$ 4	99 $\pm$ 4
60	161 $\pm$ 19	176 $\pm$ 17
120	138 $\pm$ 13	140 $\pm$ 11
180	121 $\pm$ 11	109 $\pm$ 7

Tab. 7: OGTT bei Patienten mit hypophysären Störungen.

4.3. SUBJEKTIVE SYMPTOME

Vor Testbeginn wurden alle Versuchspersonen über eventuell auftretende Symptome einer Hypoglykämie aufgeklärt. Während der gesamten Testdauer wurden die Symptome nach einem Schema abgefragt und aufgezeichnet (Tab. 8).

Symptome wie Hunger, Müdigkeit, Schwächegefühl, Herzklopfen, Schwitzen und Tremor traten bei den meisten

Probanden und Patienten auf, wobei sich eine etwas stärkere Ausprägung in den Gruppen, die Schweineinsulin erhalten hatten, abzeichnete. Einige Personen verspürten eine leichte Übelkeit, Schwindelgefühl und eine Störung der Artikulationsfähigkeit und vor allem Änderungen der visuellen Wahrnehmung, die sich durch Auftreten von "Lichtblitzen", "farbigen Mustern", "Flimmern" und "verschwommenem Sehen" bemerkbar machte. Die Ausprägung der Symptome konzentrierte sich auf einen Zeitraum von ungefähr 15 Minuten bis zu 60 Minuten nach der intravenösen Applikation des jeweiligen Insulins. Bei keiner der untersuchten Personen kam es zu einer Beeinträchtigung der Orientierung, einem Auftreten von cerebralen Krämpfen oder einer Bewußtlosigkeit.

Eine statistische Auswertung der subjektiven Symptome schien aufgrund der limitierten Testzahl und der sich bietenden geringfügigen Unterschiede nicht angebracht.

Symptome	Probanden (n = 8)		Patienten (n = 8)	
	BHI	PPI	BHI	PPI
Müdigkeit	6	7	5	5
Hunger	7	7	4	6
Schwächegefühl	2	5	5	5
Übelkeit	2	3	1	-
Herzklopfen	5	6	5	5
Schwitzen	5	8	6	6
Tremor	8	8	6	7
Schwindelgefühl	1	4	4	5
Störungen: des Sehens	3	5	5	7
der Artikulation	-	2	1	1
der Orientierung	-	-	-	-
Krämpfe	-	-	-	-
Bewußtlosigkeit	-	-	-	-

Tab. 8: Symptome während der Hypoglykämie auf Human-(BHI) und Schweineinsulin (PPI)

4.4. KURVENBESCHREIBUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

4.4.1. INSULIN

-

Probanden

Bei den Mittelwertskurven war der Seruminsulinstieg und -abfall nach Applikation von 0.12 I.U./kg Körpergewicht Human (BHI)- bzw. Schweineinsulin (PPI) bei den Probanden identisch (Abb. 6). Auch nach Gabe der niedrigeren Dosis von 0.075 I.U./kg unterschieden sich die Kurven der beiden Insuline kaum (Abb. 7). Der Maximalwert und das Integral der Kurve (AUC) war für beide Insuline bei der Dosis von 0.12 I.U./kg annähernd doppelt so hoch wie bei 0.075 I.U./kg mit $p < 0.01$ (Kurvenmaximum für BHI und PPI) bzw. $p < 0.05$ (Kurvenintegral für BHI und PPI). (Abb. 6,7; S. 57-58)

INSULIN

-

Patienten

Die mittlere Insulindosis der Patientengruppe mit Humaninsulin war geringfügig höher als die der Gruppe mit Schweineinsulin (0.12 ± 0.005 bzw. 0.15 ± 0.005 I.U./kg, $p < 0.025$). Die Seruminsulinspiegel bei Humaninsulin lagen demzufolge bei allen Kurvenpunkten etwas höher (Abb. 8). Signifikant unterschieden sich die Maxima mit $273 \pm 27 \mu\text{U/ml}$ (PPI) und $400 \pm 45 \mu\text{U/ml}$ (BHI), $p < 0.05$. Das Kurvenintegral (AUC) zeigte für Humaninsulin signifikant höhere Werte ($p < 0.005$), und auch die prozentuale Zunahme war mit $p < 0.025$ größer. (Abb. 8; S. 59)

4.4.2. C-PEPTID - Probanden

Die Suppression des endogenen Insulins, die sich in der C-Peptid-Konzentration ausdrückt, ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Human- und Schweineinsulin, auch nicht in den verschiedenen Dosen der jeweiligen Insuline (Abb. 6, 7; S. 57-58)

C-PEPTID - Patienten

Auch die C-Peptid-Kurven der Patientengruppen zeigten nahezu identischen Verlauf ohne signifikanten Unterschied (Abb. 8; S. 59)

4.4.3. BLUTGLUCOSE - Probanden

Der Abfall der Blutglucose nach Gabe von 0.12 I.U./kg Insulin verlief für Human (BHI)- und Schweineinsulin (PPI) identisch, wobei der Nadir 20 Minuten nach Injektion erreicht wurde (Abb. 6). Nach 120 min. hatte die Blutglucose noch nicht die Werte vor Insulingabe wieder erreicht (bei BHI 78 ± 4 mg/dl gegenüber initial 92 ± 3 mg/dl ($p < 0.005$), bei PPI 77 ± 5 mg/dl gegenüber $92 \pm$ mg/dl ($p < 0.005$). Nach Applikation von 0.075 I.U./kg Humaninsulin lag das Blutzuckerminimum etwas tiefer und trat früher ein als nach Schweineinsulin (Abb. 7), so daß sich die Blutzucker-Kurve von BHI im Vergleich zu PPI etwas nach links verschob. Der Unterschied der Blutglucose war zu keinem Zeitpunkt signifikant; auch die AUC differierte nicht. 120 min. nach Injektion beider Insuline waren die Basalwerte der Blutglucose wieder erreicht.
(Abb. 6,7; S. 57-58)

BLUTGLUCOSE

-

Patienten

In Abhängigkeit der leicht höheren Seruminsulinspiegel der Humaninsulingruppe lagen die mittleren Werte der Blutglucose hier etwas tiefer als die der Schweineinsulingruppe (Abb. 8). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich beim Nadir der Kurven bei 30 min. ($p < 0.05$), weiterhin bei 90 min. ($p < 0.025$) und bei 120 min. ($p < 0.0005$). Das Integral (AUC) war mit $p < 0.05$ ebenfalls signifikant kleiner nach Humaninsulin. Der absolute und relative Abfall der Blutglucose, ausgehend vom Basalwert, differierte hingegen nicht signifikant zwischen Human- und Schweineinsulin. Nach Anwendung von Schweineinsulin war der Blutglucosespiegel nach 120 min. wieder auf den Ausgangswert angestiegen, während nach Humaninsulin der 120 min.-Wert noch signifikant niedriger als der Basalwert bei 0 min. war (76 ± 6 mg/dl gegenüber 89 ± 2 mg/dl, $p < 0.05$). (Abb. 8; S. 59)

4.4.4. GLUCAGON

-

Probanden

Abb. 6 zeigt den Anstieg des Insulin-gegenregulierenden Hormons Glucagon auf die durch 0.12 I.U./kg Insulin provozierte Hypoglykämie. Die Kurvenmaxima wurden zwischen 30 und 60 min. nach Insulininjektion erreicht. Bis auf eine leichte Differenz der Basalwerte zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede des Kurvenverlaufs, der Maxima, der AUC, des Anstiegs vom Basalwert und des prozentualen Anstiegs von Glucagon zwischen Human (BHI)- und Schweineinsulin (PPI). Auf die Applikation der niedrigen Dosis von 0.075 I.U./kg beider Insuline differierten die entsprechenden Kurven des Plasmaglucagons nur gering voneinander (Abb. 7).

Die Mittelwertskurve der Schweineinsulingruppe verlief nach dem maximalen Anstieg bei 20 min. plateauartig bis 60 min., die der Humaninsulingruppe erreichte in einem langsamen Anstieg ihren Höchstpunkt erst bei 45 min. Von 75 bis 120 min. liefen beide Kurven wieder ähnlich.

Bezüglich der mittleren Werte der Plasmagluca-gonspiegel ergab sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen BHI und PPI. Auch die Maxima sowie der absolute und relative Anstieg über den Basalwert und das Kurvenintegral (AUC) differierte nicht signifikant nach BHI- bzw. PPI-Gabe.

Im Vergleich zum Kollektiv mit 0.12 I.U./kg waren die Maxima, der absolute und prozentuale Anstieg der Glucagonkonzentration im Kollektiv mit 0.075 I.U./kg signifikant niedriger. In der Reihenfolge der oben genannten Parameter ergaben sich folgende Signifikanzen:

	Maxima	absoluter Anstieg	prozentualer Anstieg
BHI 0.12/0.075 I.U./kg	$p < 0.01$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
PPI 0.12/0.075 I.U./kg	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.005$

Die Berechnung der AUC des Glucagonprofils zeigte keinen dosisabhängigen Unterschied. (Abb. 6,7; S. 57-58)

GLUCAGON

-

Patienten

Die Plasmagluca-gonkurven von BHI und PPI verliefen konstant über die gesamte Testdauer parallel, wobei die Mittelwerte bei Humaninsulin (BHI) alle tiefer als bei Schweineinsulin (PPI) lagen (Abb. 8). Die maximalen Glucagonkonzentrationen ergaben sich zwischen 30

und 60 min. nach Insulingabe; sie waren quantitativ nicht signifikant unterschiedlich nach BHI bzw. PPI. Auch die Anstiege und die integrierten Kurvenflächen zeigten keine statistisch faßbaren Differenzen. (Abb. 8; S. 59)

4.4.5. ACTH - Probanden

Die große Abweichung bei den mittleren ACTH-Spiegeln (Abb. 9, 10) macht den erheblichen interindividuellen Unterschied deutlich.

In der Humaninsulingruppe zeigte sich die höchste Ausschüttung von ACTH auf die Hypoglykämie mit 0.12 I.U./kg Insulin bei allen Probanden bei 45 min., mit Ausnahme einer Testperson, deren Gipfel bei 30 min lag (Abb. 9). Die durch Schweineinsulin der gleichen Dosis provozierte ACTH-Sekretion erreichte ihren Höchstpunkt bei einer Hälfte der Probanden nach 30 min., bei der anderen nach 45 min. und bei einer Testperson erst bei 60 min. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Human- und Schweineinsulin zeigten die Maximalsekretion, die integrierte Fläche unter der Kurve (AUC) und der absolute Anstieg des Hormons über den Basalwert.

Der prozentuale Anstieg von ACTH nach 0.12 I.U./kg Humaninsulin (BHI) war mit 1647 ± 325 % höher als nach der gleichen Dosis Schweineinsulin (PPI) (909 ± 189 %) bei einem $p < 0.05$.

In der Probanden-Gruppe II (0.075 I.U./kg) (Abb. 10) induzierte BHI bei allen 6 Probanden eine maximale ACTH-Sekretion nach 45 min. Nach der gleichen Dosis PPI hatten 4 Personen ihre höchste ACTH-Ausschüttung bei 45 min., eine Person bei 30 min. und eine weitere Testperson zeigte keinen Anstieg. Im Überblick ergaben

sich auch hier annähernd die gleichen Spitzenwerte der Plasmakonzentration, ähnliche absolute und relative Anstiege und integrierte Kurvenareale (AUC) im Vergleich der beiden Insuline.

Im Dosisvergleich von 0.12 bzw. 0.075 I.U./kg Schweineinsulin ließ sich in keinem der berechneten Parameter ein unterschiedliches Ergebnis erkennen. Nach Applikation des Humaninsulins jedoch zeigten sich bei der Dosis von 0.12 I.U./kg signifikant höhere Werte ($p < 0.05$) als nach 0.075 I.U./kg bezüglich der integrierten Hormonausschüttung (AUC), der Maxima und des absoluten und prozentualen Anstiegs der ACTH-Konzentration. (Abb. 9,10; S. 67-68)

ACTH - Patienten

Auch hier fiel die beträchtliche interindividuelle Abweichung der ACTH-Plasmaspiegel auf (Abb. 11). 15 min. nach Insulingabe begann die ACTH-Konzentration zu steigen, wobei die individuellen Maxima der Patienten zwischen 30 und 60 min. auftraten. Keiner der berechneten Parameter wies einen statistisch relevanten Unterschied zwischen BHI und PPI auf. (Abb. 11; S. 69)

4.4.6. CORTISOL - Probanden

Die Werte des Serumcortisols ließen sich in den meisten Fällen gut mit den zugehörigen ACTH-Spiegeln korrelieren. Nach 0.12 I.U./kg BHI/PPI (Abb. 6) konnte man einen beginnenden Anstieg bei 20 min., nach 0.075 I.U./kg (Abb. 7) erst 30 min. nach Insulinapplikation feststellen. Der Zeitpunkt der maximalen Cortisolkonzentration variierte interindividuell und lag in den einzelnen Gruppen zwischen 45 und 75 min. für beide Insuline

in beiden Konzentrationen. Kein Berechnungsparameter ergab eine Signifikanz im Vergleich BHI/PPI in beiden Dosen. Im Vergleich der verschiedenen Dosen miteinander zeigten sich Unterschiede, die sich aber größtenteils mit verschiedenen Ausgangswerten bereits zu Testbeginn erklären lassen: die mittleren Basalwerte der I. Gruppe (0.12 I.U./kg) lagen tiefer (BHI 8.1 µg/dl PPI 7.7µg/dl) als die der II. Gruppe (0.075 I.U./kg) (BHI:19.6 µg/dl,PPI:18.8 µg/dl). So ergaben sich in der II. Gruppe für BHI und PPI höhere Maximalkonzentrationen ($p(\text{BHI}) < 0.005$, $p(\text{PPI}) < 0.025$), und auch integrierte Kurvenflächen ($p(\text{BHI}) < 0.005$, $p(\text{PPI}) < 0.025$) sowie ein höherer prozentualer Anstieg ($p(\text{BHI}/\text{PPI}) < 0.01$) als in der I. Gruppe. (Abb. 6,7; S. 57-58)

CORTISOL

-

Patienten.

Die Cortisolsekretion beider Patientengruppen zeigte jeweils einen Hypoglykämie-induzierten Anstieg, der sich nicht wesentlich unterschied (Abb. 8). Die Mittelwertskurve des Serumcortisols der Humaninsulingruppe lag über der Kurve der Schweineinsulingruppe, wobei sich aber nur zum Zeitpunkt - 15 min. (d.h. 15 min. vor Insulinapplikation) ein Unterschied mit $p < 0.025$ herausstellte. Die übrigen Parameter der statistischen Auswertung brachten keine Differenz. (Abb. 8; S. 59)

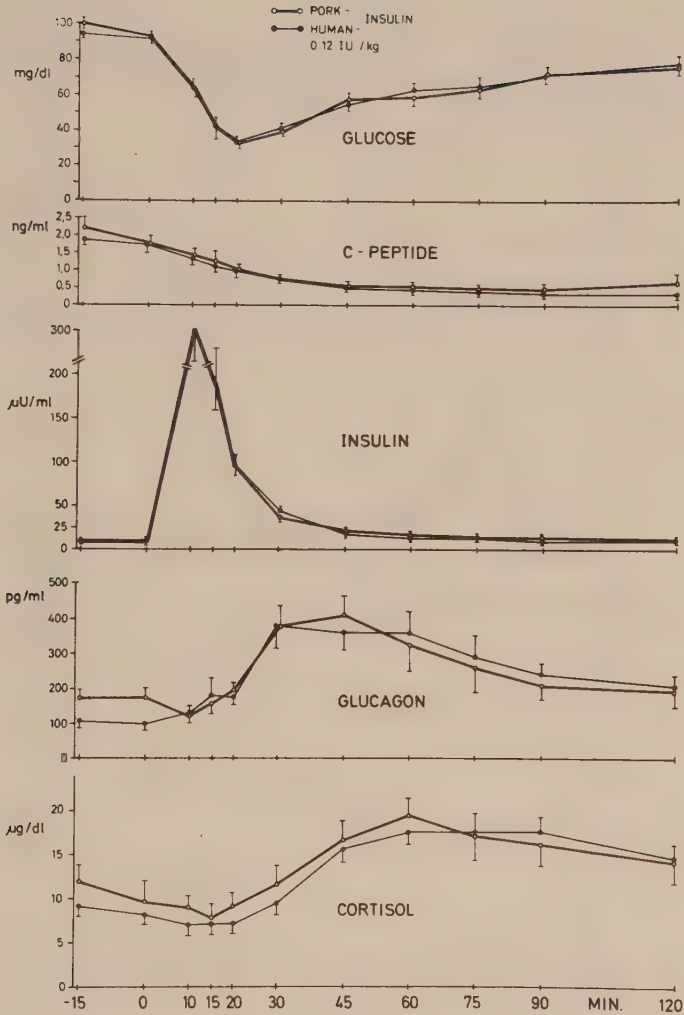


Abb. 6

Profile von Blutglucose, C-Peptid, Insulin, Glucagon und Cortisol nach Applikation von 0.12 I.U./kg KG Schweineinsulin (o—o) oder Humaninsulin (●—●) bei den gleichen gesunden Probanden. Die Kurvenpunkte entsprechen Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

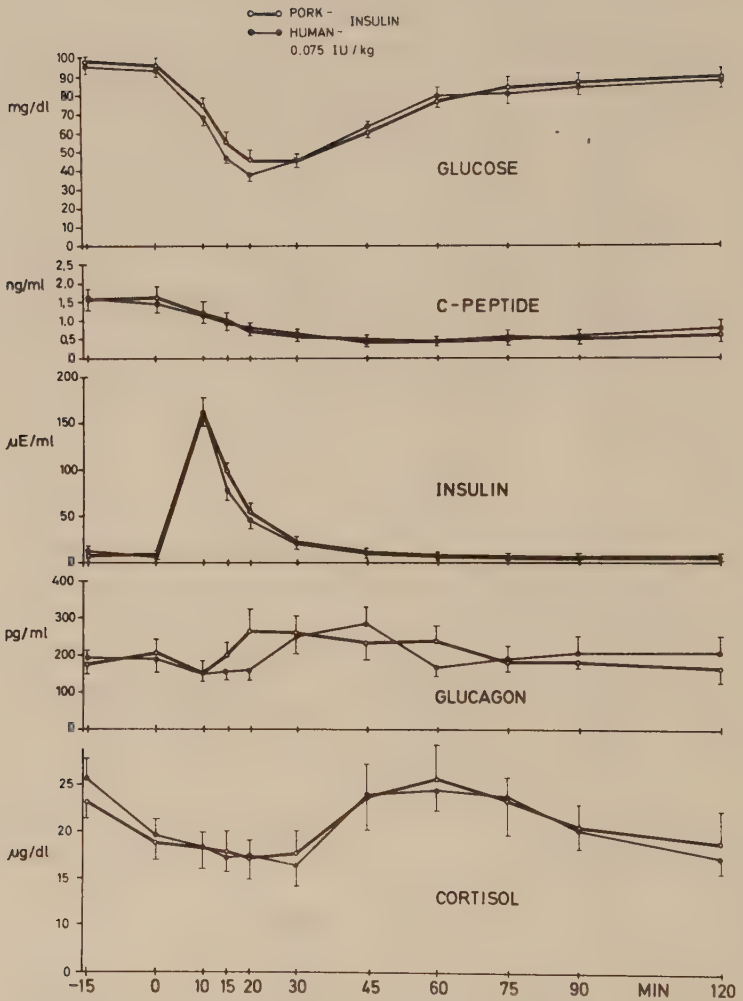


Abb. 7

Profile von Blutglucose, C-Peptid, Insulin, Glucagon und Cortisol nach Applikation von 0.075 I.U./kg KG Schweineinsulin (o—o) oder Humaninsulin (●—●) bei den gleichen gesunden Probanden. Die Kurvenpunkte entsprechen Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

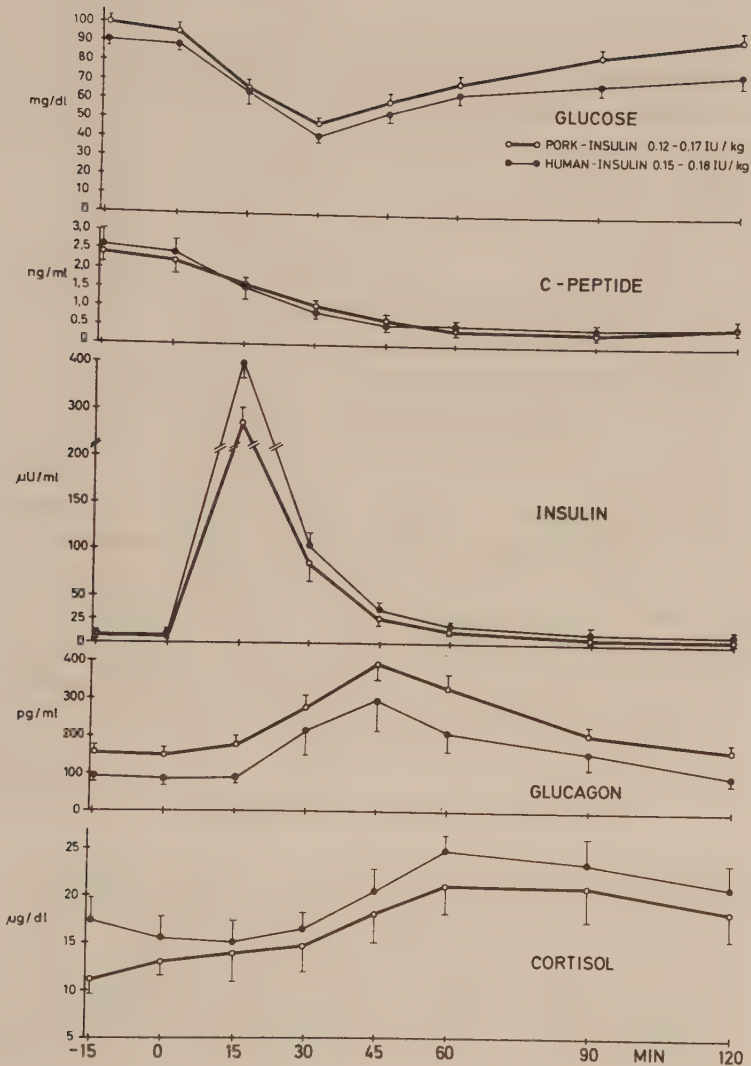


Abb. 8

Profile von Blutglucose, C-Peptid, Insulin, Glucagon und Cortisol nach Applikation von individuell errechneten Dosen (siehe Abbildung) Schweineinsulin (○—○) oder Humaninsulin (●—●) bei zwei Gruppen von Patienten mit hypophysären Störungen. Die Kurvenpunkte entsprechen Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

4.4.7. ADRENALIN

Probanden

Die höchsten Werte der Adrenalinausschüttung auf die Insulin-induzierte Hypoglykämie lagen nach Applikation beider Dosen (0.12 I.U./kg bzw. 0.075 I.U./kg Körpergewicht des Human (BHI)- und Schweineinsulins (PPI) bereits 30 min. nach Injektion. Zwischen 0.12 I.U./kg BHI und PPI zeigte sich bei keinem Kurvenpunkt ein signifikanter Unterschied (Abb. 9). Auch der absolute und prozentuale Anstieg über den Basalwert und die integrierte Kurvenfläche (AUC) differierte nicht zwischen den beiden Insulinen. Bei der Dosis von 0.075 I.U./kg ergab sich 60 min. nach Applikation von BHI ein niedrigerer Adrenalinwert als nach PPI (101 ± 12 pg/ml zu 231 ± 65 pg/ml, $p < 0.05$) (Abb. 10).

Im Vergleich der verschiedenen Dosen (0.12 bzw. 0.075 I.U./kg) jedes Insulins brachte für PPI weder im maximalen Anstieg, im absoluten und prozentualen Anstieg über den Basalwert, noch für die AUC einen signifikanten Unterschied. Bei BHI der Dosis 0.12 I.U. ergaben sich im Vergleich zu 0.075 I.U. mit $p < 0.005$ höhere Werte für alle drei Parameter. (Abb. 9,10; S. 67-68)

ADRENALIN

Patienten (Abb. 11)

Der Zeitpunkt des Adrenalinanstiegs und die maximalen Serumspiegel waren für Human- und Schweineinsulin identisch (Abb. 11). Die mittlere Serumkonzentration bei 60 min. war nach Humaninsulin ohne Signifikanz höher. Die übrigen Berechnungsparameter unterschieden sich nicht signifikant. (Abb. 11; S. 69)

4.4.8. NORADRENALIN

-

Probanden

Der Anstieg von Noradrenalin ließ sich innerhalb von 15 min. nach Applikation von 0.12 I.U./kg Humaninsulin (BHI) bzw. Schweineinsulin (PPI) verzeichnen, wobei das Maximum bei allen Probanden bei 30 min. erreicht war (Abb. 9). Es zeigten sich bei den Berechnungskriterien keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Insulinen.

Der Noradrenalinanstieg auf 0.075 I.U./kg beider Insuline war weniger stark ausgeprägt, wobei aber die Spitzenwerte signifikant höher als die Basalwerte lagen (Abb. 10). 50 % der Probanden erreichte den Maximalwert bei 30 min., 50 % zwischen 60 und 120 min. Wie bei der hohen Dosis waren auch hier keine Unterschiede zwischen BHI und PPI zu sehen.

Signifikant differierten die Ergebnisse bezüglich der beiden Dosen von 0.12 bzw. 0.075 I.U./kg des jeweiligen Insulins: (Abb. 9,10; S. 67-68)

Insulin-Dosis I.U./kg	0.12	0.075	p
Adrenalin-Konzentration (pg/ml) nach BHI-Injektion	544 $\pm$ 40	324 $\pm$ 39	p < 0.005
Adrenalin-Konzentration (pg/ml) nach PPI-Injektion	646 $\pm$ 119	324 $\pm$ 68	p < 0.025

Tab. 9: Adrenalinmaxima nach Injektion von 0.12 bzw. 0.075 I.U./kg BHI oder PPI

Insulin-Dosis I.U./kg	0.12	0.075	p
Adrenalin-Anstieg (pg/ml) nach BHI-Injektion	327 $\pm$ 14	140 $\pm$ 41	p < 0.01
Adrenalin-Anstieg (pg/ml) nach PPI-Injektion	376 $\pm$ 72	141 $\pm$ 48	p < 0.025

Tab. 10: Absoluter Adrenalinanstieg über den Basalwert (pg/ml) nach Injektion von 0.12 bzw. 0.075 I.U./kg Körpergewicht BHI oder PPI bei gesunden Probanden.

Der prozentuale Anstieg über den Basalwert verhielt sich nicht signifikant unterschiedlich. Die Flächen unter den Kurven (AUC) der beiden Dosen von Schweineinsulin unterschieden sich nicht, im Gegensatz zu denen von Humaninsulin:

Insulin-Dosis I.U./kg	0.12	0.075	p
AUC nach Injektion von BHI (pg/ml)	46430 $\pm$ 380	31667 $\pm$ 403	p<0.05

Tab. 11: Flächenintegrale unter den Adrenalinkurven (AUC) nach Injektion von 0.12 bzw. 0.075 I.U./kg Körpergewicht BHI oder PPI bei gesunden Probanden.

NORADRENALIN

-

Patienten

Die Noradrenalinausschüttung nach Humaninsulin war etwas höher als nach Schweineinsulinbelastung (Abb. 11). Es stellte sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Einzelpunkte, der integrierten Fläche unter der Kurve (AUC), der Maximalkonzentrationen und des absoluten und relativen Anstiegs über den Basalwert heraus. (Abb. 11; S. 69)

4.4.9. WACHSTUMSHORMON (hGH)- Probanden

Der hypoglykämiebedingte Anstieg des Wachstumshormons erreichte 60 min. nach Insulininjektion seinen Höchstwert. Es ergab sich kein Unterschied sämtlicher berechneter Parameter zwischen Human- und Schweineinsulin, auch nicht zwischen den beiden verschiedenen Dosen (0.12 und 0.075 I.U./kg) der Insuline (Abb. 9, 10, S. 67-68)

WACHSTUMSHORMON (hGH) - Patienten

Bei beiden Patientengruppen (BHI und PPI) zeigte sich im Vergleich zu den entsprechenden Probandenkollektiven ein deutlich schwächerer Anstieg des Wachstumshormons (Abb. 11): die Maxima der Probanden lagen zwischen 26 und 35 ng/ml, die der Patienten zwischen 5 und 14 ng/ml.

Das hGH-Maximum war bei Humaninsulin (BHI) (5 ± 2 ng/ml ausgehend von 1.8 ± 0.8 basal) mit $p < 0.05$ signifikant erhöht; bei Schweineinsulin (PPI) (14 ± 6 ng/ml, ausgehend von 1.7 ± 0.9 basal) mit $p < 0.01$ erhöht. Die mittlere Konzentration von hGH, die individuellen Maxima, die AUC und auch der absolute Anstieg über den Basalwert unterschieden sich nicht signifikant nach Applikation von BHI bzw. PPI. Die einzige signifikante Differenz bildete der prozentuale Anstieg über den Basalwert, der nach BHI (313 ± 229 %) niedriger als nach PPI (1775 ± 1123 %) war ($p < 0.05$). (Abb. 11; S. 69)

4.4.10. PROLACTIN (hPRL). - Probanden

Die Reaktion des hPRL auf den Hypoglykämiestreß ließ eine deutliche Abhängigkeit von der applizierten Insulindosis erkennen. Der hPRL-Anstieg ereignete sich ca. 30 min nach Applikation von 0.12 I.U./kg Human- bzw. Schweineinsulin, ca. 10 min. nach dem Nadir des Blutzuckers (Abb. 9). Die Kurven der beiden Insuline stiegen nahezu identisch auf ein Maximum bei ca. 45 min. Im Abfall war die Kurve der Humaninsulin-induzierten hPRL-Ausschüttung nach oben verschoben, wobei aber der Unterschied nicht signifikant war.

Bei Gabe der Dosis von 0.075 I.U./kg war nach Schweineinsulin (PPI) eine ähnliche Tendenz zu verzeichnen, während nach der gleichen Dosis Humaninsulin (BHI) nur ein leichtes Ansteigen des hPRL ersichtlich war (Abb. 10). Bei einem Probanden blieb der Anstieg ganz aus.

Die Berechnung der individuellen Maxima, des absoluten und relativen Anstiegs über den Basalwert und der integrierten Fläche unter den Kurven (AUC) ergab bei der Dosis von 0.12 I.U./kg keinen signifikanten Unterschied zwischen BHI und PPI. Nach Applikation der niedrigen Dosis von 0.075 I.U./kg unterschieden sich die beiden Insuline in allen errechneten Parametern. (Abb. 9,10; S. 67-68)

MAXIMA von hPRL ($\mu\text{U/ml}$)

Nach BHI-Injektion	Nach PPI-Injektion	p
334 ± 65	1039 ± 474	$p < 0.05$

ABSOLUTER ANSTIEG von hPRL ($\mu\text{U/ml}$)

Nach BHI-Injektion	Nach PPI-Injektion	$p < 0.05$
161 ± 65	768 ± 466	

Tab. 12: Maxima und absoluter Anstieg von hPRL ($\mu\text{U/ml}$) nach Injektion von 0.075 I.U./kg KG BHI oder PPI bei gesunden Probanden.

RELATIVER ANSTIEG von hPRL (in %)

Nach BHI-Injektion	Nach PPI-Injektion	$p < 0.05$
115 ± 55	335 ± 207	

KURVENINTEGRAL (AUC) von hPRL ($\mu\text{U/ml}$)

Nach BHI-Injektion	Nach PPI-Injektion	$p < 0.05$
27354 ± 6349	85843 ± 32197	

Tab. 13: Relativer Anstieg und AUC von hPRL ($\mu\text{U/ml}$) nach Injektion von 0.075 I.U./kg KG BHI oder PPI bei gesunden Probanden.

Im Vergleich der beiden Dosen BHI (0.12 und 0.075 I.U./kg) unterschieden sich die Maxima (1554 ± 505 gegenüber 334 ± 65 , $p < 0.025$), der relative Anstieg (1550 ± 729 gegenüber $115 \pm 55 \mu\text{U/ml}$, $p < 0.005$). Die Kurvenintegrale

differierten hier nicht signifikant voneinander. Beim Schweineinsulin ergab sich nur im relativen Anstieg über den Basalwert ein dosisabhängiger Unterschied (1188 ± 346 gegenüber $335 \pm 207 \mu\text{U/ml}$. (Abb. 9,10; S. 67-68)

PROLACTIN (hPRL) - Patienten

Die Basalwerte der hPRL-Serumkonzentrationen lagen entschieden höher und wiesen eine größere interindividuelle Abweichung auf als die der Probandengruppe (Abb. 11). Da von den 16 Patienten mit einer hypophysären Erkrankung sieben einen hPRL-produzierenden Tumor hatten, erklären sich die enormen Schwankungen innerhalb der Kollektive von selbst. Zwei Patienten in beiden Gruppen reagierten auf die Hypoglykämie ohne Anstieg des Serum-PRL. Eine Abhängigkeit des Hormonanstiegs von einer Insulinsorte ließ sich aufgrund der stark variierenden Werte der übrigen Patienten nicht mit Sicherheit feststellen:

	BHI		PPI	
hPRL-MAXIMA ($\mu\text{U/ml}$)	3510 ± 2562		13809 ± 11875	
		p 0.01		p 0.005
hPRL-BASALWERTE ($\mu\text{U/ml}$)	2834 ± 2113		11237 ± 10275	

Tab. 14: hPRL-Konzentration nach Injektion von BHI oder PPI bei Patienten mit hypophysären Erkrankungen.

Der maximale Anstieg über den Basalwert war für beide Insuline signifikant.

Obwohl die Mittelwertskurve der PPI-Gruppe weit unter der der BHI-Gruppe lag, ergaben sich rechnerisch aufgrund der erheblich differierenden Basalwerte und somit großen Abweichungen von $\bar{x}$ keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Insulinen.

(Abb. 11; S. 69)

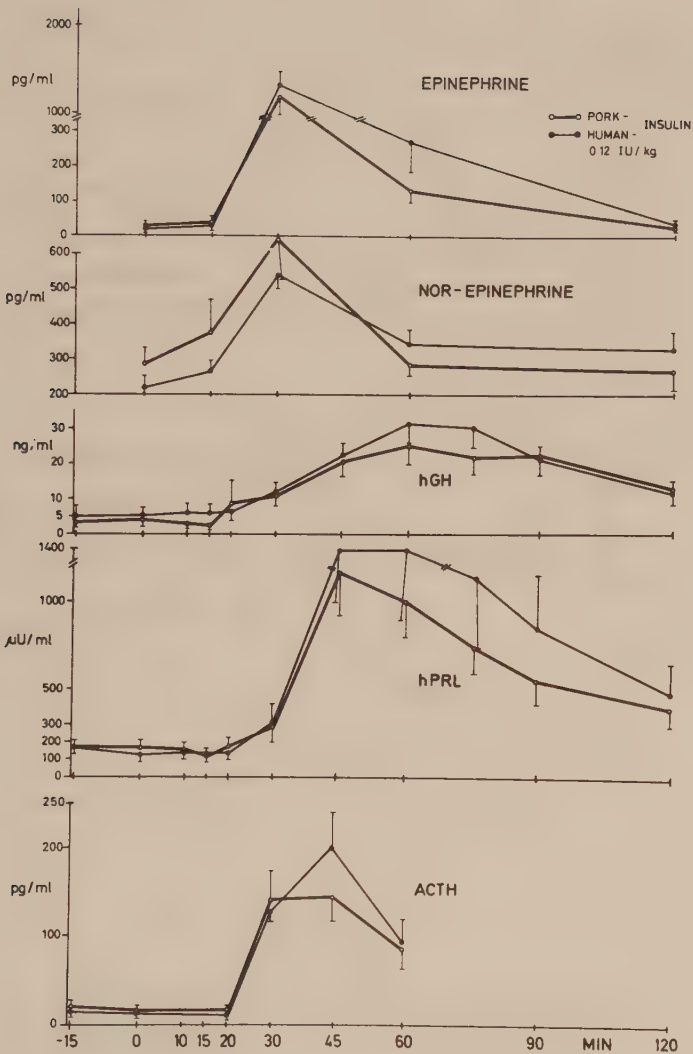


Abb. 9

Profile der gegenregulierenden Hormone Adrenalin, Noradrenalin, Wachstumshormon (hGH), Prolactin (hPRL) und ACTH nach Applikation von 0.12 I.U./kg KG Schweineinsulin (o—o) oder Humaninsulin (●—●) bei den gleichen gesunden Probanden. Die Kurvenpunkte entsprechen Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

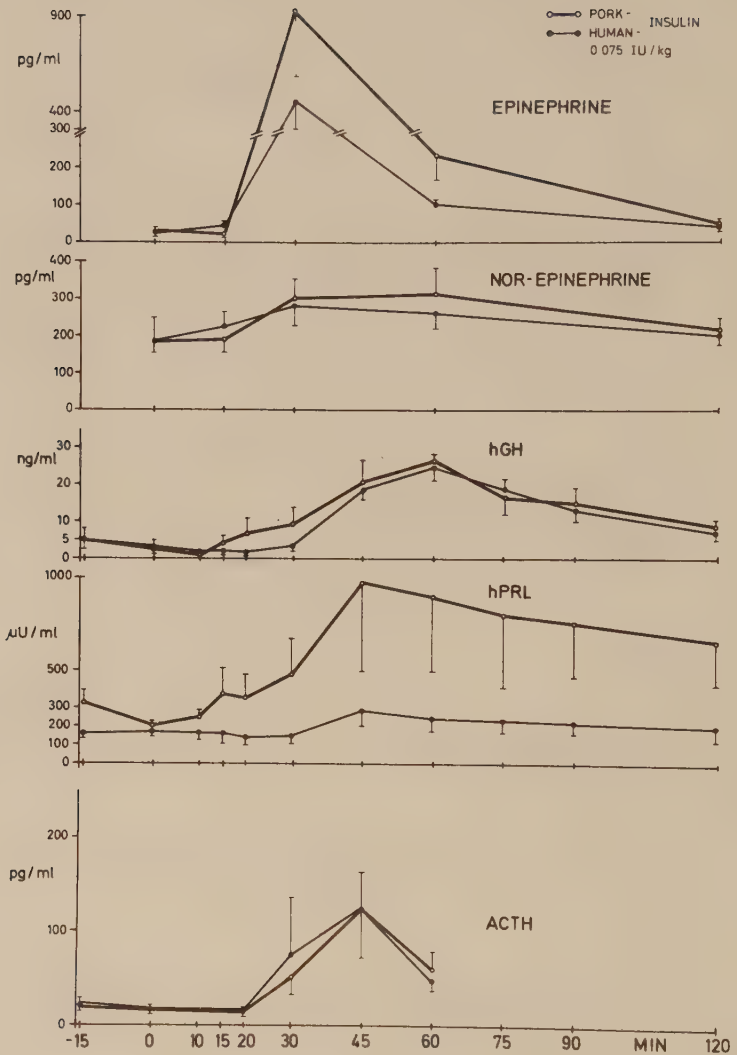


Abb. 10

Profile der gegenregulierenden Hormone Adrenalin, Noradrenalin, Wachstumshormon (hGH), Prolactin (hPRL) und ACTH nach Applikation von 0.075 I.U./kg KG Schweineinsulin (○—○) oder Humaninsulin (●—●) bei den gleichen gesunden Probanden. Die Kurvenpunkte entsprechen Mittelwerten + Standardabweichung.

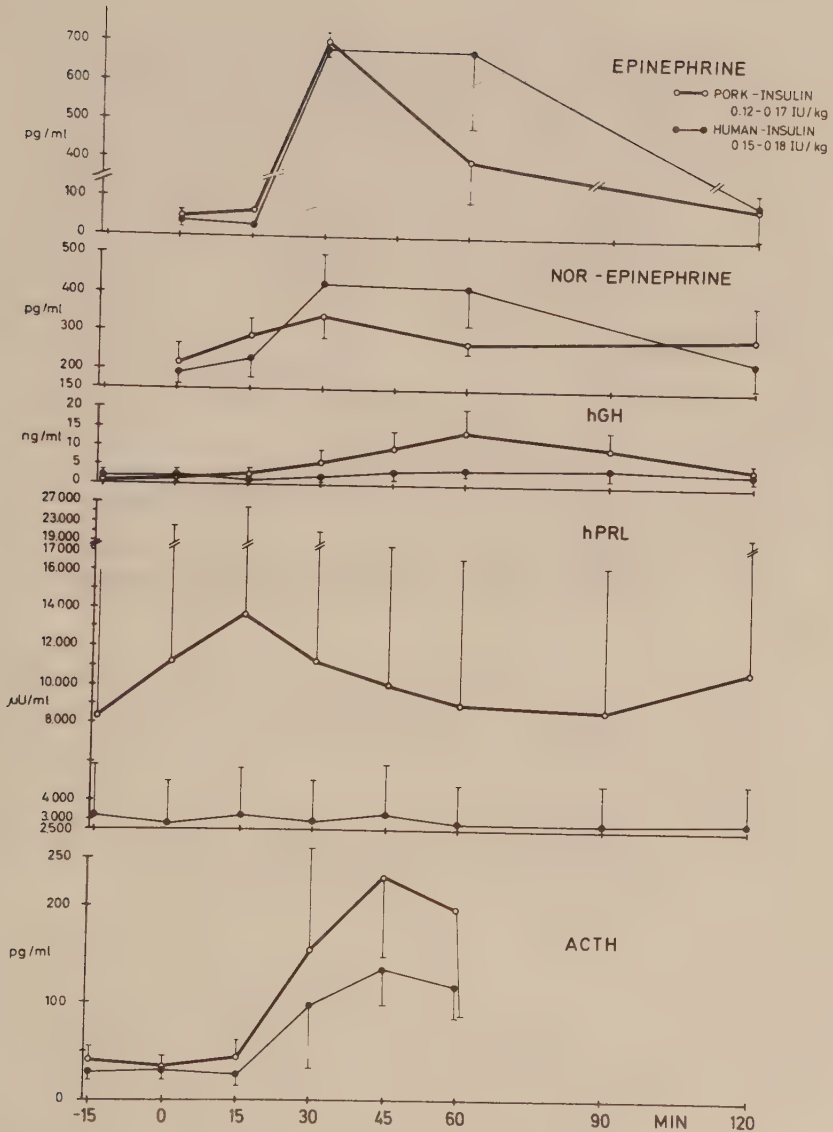


Abb. 11

Profile der gegenregulierenden Hormone Adrenalin, Noradrenalin, Wachstumshormon (hGH), Prolactin (hPRL) und ACTH nach Applikation von individuell errechneten Dosen (siehe Abbildung) Schweineinsulin (○—○) oder Humaninsulin (●—●) bei zwei Gruppen von Patienten mit hypophysären Störungen. Die Kurvenpunkte entsprechen Mittelwerten + Standardabweichung.

4.4. 11.KALIUM

Probanden

Der Abfall des Serumkaliums in Abhängigkeit des sinkenden Blutzucker-Spiegels ließ sich für Human- und Schweineinsulin in beiden Dosierungen signifikant zum Basalwert verfolgen (Abb. 12, 13).

	Insulin-Dosis I.U./kg BHI	K ⁺ (mmol/l)	Insulin-Dosis I.U./kg PPI	K ⁺ (mmol/l)
Basalwerte	0.12	4.4	0.12	4.1
	0.075	4.1	0.075	3.9
Minima	0.12	3.5	0.12	3.4
	0.075	3.6	0.075	3.6

Tab. 15: Abfall des Serumkaliums (mmol/l) nach Injektion von 0.12 bzw. 0.075 I.U./kg KG BHI oder PPI bei gesunden Probanden.

Der Nadir lag ungefähr bei 45 min., ca. 20 min. später als das Kurvenminimum der Blutglucose. Nach 120 min. war der Ausgangswert der Serumkonzentration zum Punkt 0 min. nahezu erreicht.

Human- und Schweineinsulin unterschied sich in keinem der statistischen Parameter voneinander; es ergab sich auch keine dosisabhängige Abweichung.

(Abb. 12,13; S. 72-73)

KALIUM

-

Patienten

Auch hier war nach 45 min. der tiefste Wert der Serum-Kalium-Konzentration erreicht (Abb. 14). Die Kurven verliefen etwas flacher als bei der Probandengruppe und erreichten bei 120 min. nicht die Ausgangswerte. In der Auswertung der statistischen Parameter ließ sich keine signifikante Differenz zwischen Human- und Schweineinsulin ersehen.

(Abb. 14; S. 74)

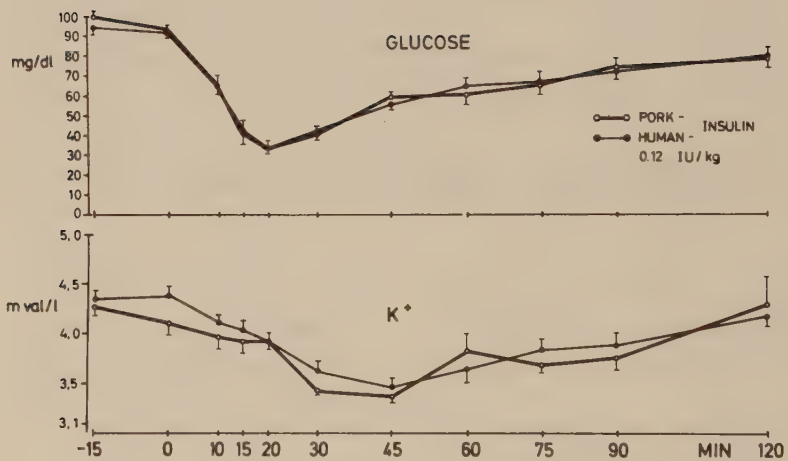


Abb. 12

Verlauf des Kaliums in Abhängigkeit des Blutglucose-Spiegels nach Applikation von 0.12 I.U./kg KG Schweineinsulin (o—o) oder Humaninsulin (●—●) bei den gleichen gesunden Probanden. Die Kurvenpunkte entsprechen Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

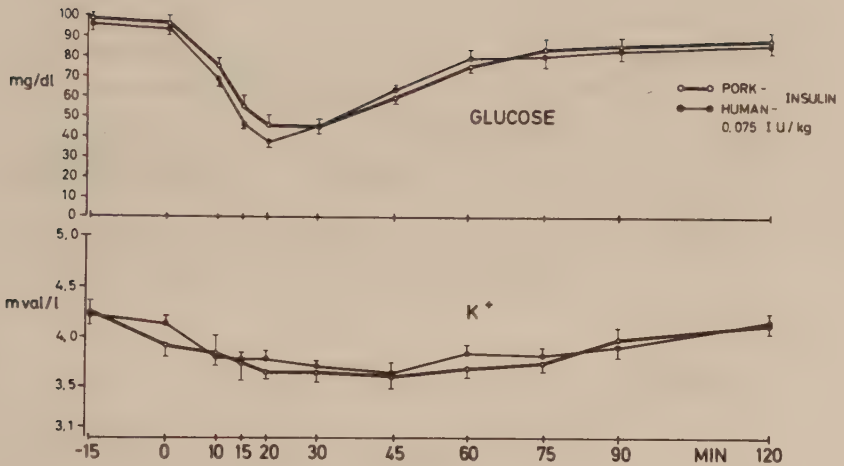


Abb. 13

Verlauf des Kaliums in Abhängigkeit des Blutglucose-Spiegels nach Applikation von 0.075 I.U./kg KG Schweineinsulin (o—o) oder Humaninsulin (●—●) bei den gleichen gesunden Probanden. Die Kurvenpunkte entsprechen Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

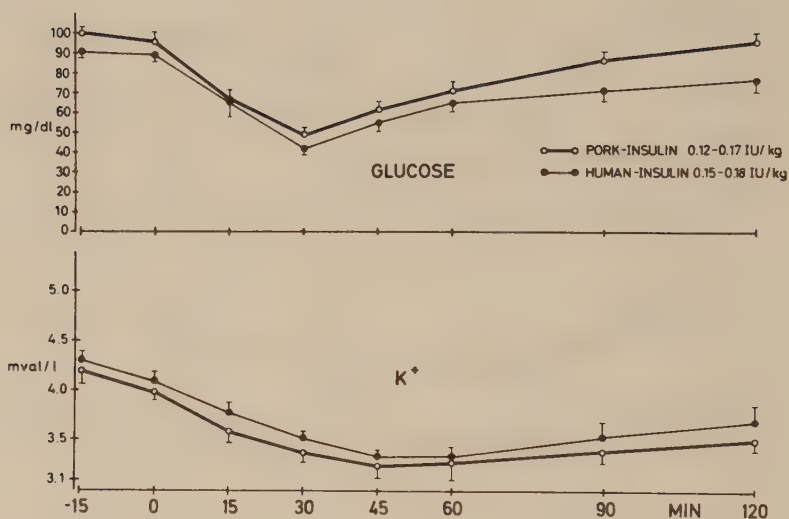


Abb. 14

Verlauf des Kaliums in Abhängigkeit des Blutglucose-Spiegels nach Applikation individuell errechneter Dosen (siehe Abbildung) Schweineinsulin (○—○) oder Humaninsulin (●—●) bei zwei Gruppen von Patienten mit hypophysären Störungen. Die Kurvenpunkte entsprechen Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

5. DISKUSSION

Seit Humaninsulin für den klinischen Gebrauch verfügbar ist, stehen die möglichen Vorteile dieser neuen Insulinspezies im Mittelpunkt der Diskussion (Übersichten: 18, 58, 121, 122, 92). Es kann nur auf lange Sicht in kontrollierten Studien beurteilt werden, ob diese Insuline eine Verbesserung in der Therapie diabetischer Patienten und einen Fortschritt der Prävention von Spätkomplikationen dieser Krankheit, speziell der Makroangiopathie bringen werden. Die zahlreichen Untersuchungen mit diabetischen Patienten erbrachten eine Vielfalt von zum Teil widersprüchlichen Informationen. Während einige Autoren die oft beschriebenen Unterschiede zwischen tierischen und humanen Insulinen nicht akzeptieren (132, 127, 48, 36), führen andere mögliche Vorteile von Humaninsulin hinsichtlich der Stoffwechselführung diabetischer Patienten an, wie z.B. bessere Einstellung der Blutzuckerwerte, Sinken der $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Spiegel (20, 22, 37).

Die vorliegende Studie wurde unternommen, um den Effekt von intravenös appliziertem biosynthetischem Humaninsulin (BHI) im Vergleich zu hochgereinigtem Schweineinsulin (PPI) auf eine Anzahl von unterschiedlichen metabolischen und hormonellen Parametern zu untersuchen und das für jedes Insulin spezifische Muster der hormonellen Gegenregulation in der Insulin-induzierten Hypoglykämie miteinander zu vergleichen. Untersucht wurden ein Kollektiv gesunder Probanden im intraindividuellen Vergleich und zwei Gruppen von Patienten mit hypophysären Erkrankungen, die man interindividuell gegenüberstellte.

Nach intravenöser Injektion von Insulin kommt es zunächst zu einer Bindung der Hormone an die Rezeptoren der verschiedenen Zellsysteme und zur Blockade oder Aktivierung der an den Rezeptor assoziierten Enzymsysteme (113). Das meßbare Ergebnis ist die Senkung des Blutglucosespiegels über die Stimulation der Glucoseutilisation und die Hemmung der Gluconeogenese, weiterhin die Antilipolyse, Antiketogenese und eine Senkung von Phosphat und Kalium.

Bei der Probandengruppe zeigten Human- und Schweineinsulin den gleichen Blutglucose-senkenden Effekt. Die Untersuchung wurde in zwei unterschiedlichen Dosierungen (0.075/0.15 I.U./kg Körpergewicht) durchgeführt. Diese Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Untersuchungen (91, 99, 113) überein. Eine Übersicht zahlreicher in vitro-Versuche zeigt nahezu gleiche Resultate bezüglich der Rezeptorbindung und der biologischen Aktivität von BHI und PPI (81). Unberücksichtigt bleiben hier Faktoren, von denen letztlich die Insulinaktivität in vivo abhängig ist, wie z.B. die Aufnahme aus dem Injektionsdepot, seine Verteilung in den Körperflüssigkeiten, die Kinetik der Umverteilung an den Rezeptoren und schließlich der Abbau des Insulins. Bei vorbehandelten Patienten können zirkulierende Antikörper eine große Rolle bei der eingeschränkten Bioverfügbarkeit des zugeführten Insulins spielen. Von mehreren Autoren wurden identische Eliminationsraten aus dem Plasma und ähnliche Rezeptorbindung von Human- und Schweineinsulin beschrieben (81, 93, 60, 2). Untersuchungen mit dem Glucose-kontrollierten Infusionssystem (23, 107) konnten einen signifikant höheren Glucoseverbrauch nach BHI-Applikation (im Vergleich zu PPI) und somit einen unter diesen Bedingungen bestehenden Unterschied im Metabolismus dieser beiden Insuline herausstellen.

Christensen et al. (24) konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. In ihren Untersuchungen unter Glucose-gesteuerter Insulin-Infusion über 24 Stunden waren Insulinverbrauch, Blutglucosewerte, Glucagonspiegel und hGH-Ausschüttung nach Anwendung beider Insuline annähernd gleich.

Staten et al (127) arbeiteten mit der Glucose-Clamping-Methode. Sie erhielten Glucose-Insulin Dosis-Kurven, die bei den beiden Insulinen im wesentlichen gleich verliefen.

Der Abfall des Serum-Kaliums war bei beiden Insulinen in Übereinstimmung mit anderen Publikationen (84) gleich. Schlüter et al. (110, 91) fanden einen nach BHI geringer ausgeprägten Abfall des Kaliums, den sie auf die gleichzeitig bestehende niedrigere Adrenalinantwort zurückführten. Heine et al. (52) beschrieben ebenfalls nach Applikation von Humaninsulin (semisynthetisch) einen im Vergleich zu Schweineinsulin geringeren Kaliumabfall im Glucose-Clamping-Versuch, während der Glucoseverbrauch nach beiden Insulinen ähnlich war.

Die Serum-Insulinspiegel zeigten nach i.v.-Applikation von BHI und PPI gleiche Werte, wie sich auch in anderen Untersuchungen bestätigen konnte. Nach intramuskulärer oder subcutaner Verarbeitung von BHI wurde eine schnellere Anflutung dieses Insulins beobachtet, die einer beschleunigten Freisetzung aus dem applizierten Depot zugeschrieben wurde (61, 8, 97, 49, 96).

Wie sich in mehreren Studien herausstellte, wird die Bioverfügbarkeit des subcutan applizierten Insulins von verschiedenen Faktoren wie Hauttemperatur, Injektionstechnik, und -stelle, lokale Massage, Muskelarbeit,

Stoffwechsellaage beeinflusst (49, 24). Man suchte nach Erklärungen, weshalb Humaninsulin insbesondere nach s.c.-Injektion dem Organismus eher zur Verfügung steht als Insuline anderer Spezies (119, 97). Eine bessere Absorption des Depots im subcutanen Fettgewebe aufgrund einer stärkeren Hydrophilie des Humaninsulins (49) oder ein geringerer Abbau (7) an der Injektionsstelle, eine raschere lokale Mobilisation vom Injektionsort und eine abgeschwächte Antikörper-Bildung (8) wurden als mögliche Faktoren dieses Phänomens herangezogen.

Die Hemmung der endogenen Insulinausschüttung wurde über das Serum-C-Peptid gemessen. In der vorliegenden Studie war es unter beiden Insulinen der unterschiedlichen Konzentrationen deutlich supprimiert und zeigte einen fast identischen Verlauf der Serumkonzentrationen.

Postuliert wurde von Raptis et al. (96, 97) eine im Vergleich zu Schweineinsulin stärkere Suppression des endogenen Insulins nach BHI-Applikation, die sich in einem signifikant niedrigeren C-Peptid-Spiegel ausdrückte.

Schlüter et al. (107) erzielten im Glucose-gesteuerten Infusionssystem unter euglykämischen Bedingungen weder nach BHI- noch nach PPI-Applikation einen C-Peptid-Abfall, ein Ergebnis, das der Hypoglykämie in der Bedeutung der endogenen Insulinsuppression eine tragendere Rolle als dem Hyperinsulinismus einräumt (4).

Die in dieser Studie untersuchten gegenregulatorischen Hormone Glucagon, Cortisol, Adrenalin, Noradrenalin, Wachstumshormon (hGH), ACTH und Prolactin (hPRL) zeigten keine gravierenden Unterschiede zwischen der Human- und Schweineinsulingruppe in der Dosierung von 0.12 I.U./kg Körpergewicht Insulin bei den Probanden. Die Vergleichskriterien bestanden in der maximalen Serum-

konzentration, in der unter der Mittelwertskurve integrierten Kurvenfläche (AUC) und dem absoluten und relativen Hormonanstieg vom Nullwert.

Beim gesunden Menschen zählt der Anstieg des Glucagons neben der verstärkten Adrenalinsekretion während einer Hypoglykämie zu den wichtigsten Mechanismen in der Gegenreaktion auf diese Stoffwechselsituation. Die Erholung von einem Unterzucker bleibt nur aus, wenn beide Systeme nicht ansprechen (28). Gerade aber der diabetische Patient hat während einer hypoglykämischen Phase eine inadäquate Glucagonausschüttung, möglicherweise bedingt durch eine verminderte Ansprache der A-Zellen des Pankreas (15, 6, 13, 45).

Bolli et al (12) untersuchten Patienten, die unterschiedlich lange an einem Diabetes mellitus Typ I litten. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß die Patienten, die erst kurz erkrankt waren, einen - verglichen mit gesunden Personen - normalen Glucagonanstieg während einer Hypoglykämie hatten, während Patienten mit einer Diabetesmanifestation von 1 bis 5 Jahren sich deutlich langsamer von der Hypoglykämie bei vermindertem Glucagonanstieg erholten. Die Phase der Regeneration und Erlangung einer normoglykämischen Stoffwechselsituation war bei Patienten, die zusätzlich Antikörper gegen Insulin hatten oder Patienten mit autonomer diabetischer Neuropathie noch stärker verzögert.

Eine von Boden et al. (11) untersuchte Gruppe Insulin-unabhängiger Diabetiker ohne autonome diabetische Neuropathie wurde einem Insulin-Hypoglykämie-Test unterzogen. Dabei stellte sich heraus, daß die diabetischen Patienten ähnliche Werte der gegenregulierenden Hormone hatten wie eine Gruppe gesunder Probanden (Glucagon, Adrenalin, Noradrenalin, hGH), d.h. einen intakten Mechanismus zur Gegenregulierung auf eine akut auftretenden

de Hypoglykämie besaßen. Die routinemäßige Durchführung eines Insulin-Infusionstests bei Diabetikern vor Einleitung einer Insulin-Therapie könnte somit unvorhersehbare Hypoglykämien infolge mangelnder Gegenregulierung verhindern (11).

Bolli et al. (14) stellten einen Test zur Prüfung dieses wichtigen Regulationsmechanismus vor, der das Hypoglykämie-Risiko vor allem für Patienten, die an einem Insulin-abhängigen Diabetes mellitus oder an einer autonomen diabetischen Neuropathie leiden oder unter medikamentöser B-Blockade stehen.

Im Vergleich zu Schweineinsulin wurde Humaninsulin eine schneller eintretende Hemmung des Glucagon-Outputs bzw. ein herabgesetzter reaktiver Glucagonanstieg zugeschrieben (96, 69). Eine gleichzeitige Suppression der freien Fettsäuren (FFS) wurde als antilipolytisch und antiketogen wirkender Effekt zitiert. Hinsichtlich der aus hohen Blutfettspiegeln resultierenden Spätkomplikationen des Diabetes mellitus wurde dieser suppressive Effekt des Humaninsulins positiv herausgestellt. Schlüter et al. (110) konnten bei einer etwas niedrigeren Dosis (0.1 I.U. Insulin/kg Körpergewicht) eine signifikant höhere Adrenalin-, Cortisol- und hGH-Ausschüttung auf eine Schweineinsulin-provozierte Hypoglykämie im Vergleich zu Humaninsulin auslösen. Dieses Ergebnis fand bei anderen Autoren keine Übereinstimmung (84).

Die gleiche Gruppe kam in weiteren Untersuchungen (99, 100, 110) zu dem Resultat, daß eine Senkung der Insulindosis auf 0.075 I.U./kg signifikante Unterschiede in den biologischen Eigenschaften bewirkte.

Die Probanden der vorliegenden Studie wurden daraufhin noch einmal in dieser Dosis untersucht. Dabei erreichte das Blutzuckerminimum wie erwartet nicht die Werte der ersten Untersuchung mit 0.12 I.U./kg Insulin und

das Integral des Glucoseabfalls war signifikant kleiner. Im Hormonspektrum ergab sich als einziger signifikanter Unterschied eine nach Humaninsulin kleinere hPRL-Ausschüttung. Die Adrenalin Spiegel waren nach BHI ebenfalls niedriger im Vergleich zu PPI, allerdings ohne Signifikanz. Die klinische Bedeutung des Phänomens, daß es nach BHI-Gabe in der gewählten Dosierung zu keiner oder nur geringer hPRL-Sekretion aus der Hypophyse kommt, ist gegenwärtig noch schwierig einzuordnen. Prolactin hat allem Anschein nach eine diabetische Potenz (71, 134, 119) und wird in verschiedenen Streßsituationen vermehrt sezerniert (85).

Da die Ausschüttung gegenregulatorischer Hormone von Glucose- und vielleicht Insulin-sensitiven Bezirken im Hypothalamus (19, 131, 143) abhängig ist, sind diese Ergebnisse von Interesse, da sie einen Hinweis auf mögliche Unterschiede im zentralen Angriff der beiden Insuline bei ähnlicher peripherer Wirkung (z.B. Blutzuckersenkung) geben. In Rezeptor-Bindungs-Studien mit Human- und Schweineinsulin konnten in verschiedenen Strukturen von Schweinegehirnen (medialer Hypothalamus, Hypophysenstiel, Hypophysenvorderlappen und -hinterlappen) Insulin-Rezeptoren nachgewiesen werden. Die Rezeptor-Affinität der Humaninsuline (Biosynthetisches und Semisynthetisches Humaninsulin) war in allen vier Gewebeproben signifikant niedriger im Vergleich zu Schweineinsulin (109). Diese Ergebnisse können möglicherweise therapeutische Konsequenzen für Insulin-behandelte Patienten nach sich ziehen.

In dieser Studie und auch in anderen Publikationen (99, 110, 96, 129) wurde festgestellt, daß bei einigen Personen während der Insulin-induzierten Hypoglykämie die Intensität der Symptomatik und die klinischen Zeichen

eines Unterzuckers auf Humaninsulin weniger ausgeprägt waren.

Diese geringere Gegenregulierung des Organismus auf Humaninsulin könnte einen Vorteil in der Einstellung von Patienten mit stark schwankenden Blutzuckerwerten (Brittle-Diabetiker) bieten (110). Der andere Aspekt betrifft jedoch die aus der herabgesetzten Gegenregulierung möglicherweise resultierenden Gefahren für den diabetischen Patienten.

Unveröffentlichte Daten ergaben, daß sich ca. 5 bis 10 % mit BHI behandelter Patienten über das Fehlen der Prodromi einer drohenden Hypoglykämie beklagten. Wie bereits erwähnt, stellten einige Studien bei Typ I-Diabetikern eine im Vergleich zu gesunden Probanden geringere Glucagonausschüttung während einer Hypoglykämie und auch eine Verzögerung des Blutglucoseanstiegs heraus, dessen Ursache in einem verminderten Adrenalinanstieg, bedingt durch eine autonome diabetische Neuropathie, zu liegen schien (12).

Versagen beim diabetischen Patienten während einer Hypoglykämie die beiden wichtigsten Systeme der Gegenregulierung - eine Erhöhung der Glucagon- und Adrenalinsekretion - so ist ihm die Möglichkeit genommen, diese prekäre Stoffwechselsituation zu beherrschen (10). Da diabetische Patienten besonders zu kardiovaskulären Erkrankungen, wie z.B. Hypertonus, Angina pectoris, disponiert sind, wird oft eine Therapie mit B-Rezeptorenblockern in Erwägung gezogen, ohne zu bedenken, daß diese Medikamente die metabolische Gegenregulierung während einer Hypoglykämie stark beeinflussen.

Bei einer Untersuchung unter hypoglykämischen Bedingungen (10) senkte sich der Blutzuckerspiegel unter B-Blockade bei Diabetikern stärker und die Erholungszeit aus der Hypoglykämie war entschieden länger

als bei der Kontrollgruppe gesunder Probanden, ein Ergebnis, das die Bedeutung des intakten Adrenalin-stimulus beim Patienten mit inadäquater Glucagon-sekretion in einer hypoglykämischen Stoffwechsella-ge aufzeigt.

Die Schlüsselhormone (Glucagon, Cortisol, hGH und Catecholamine) der Gegenregulierung während einer akuten Hypoglykämie waren bei gesunden Probanden un-ter medikamentöser B-Blockade mit nicht-selektiven Präparaten (z.B. Propanolol) deutlich angestiegen (26, 66). Die Erholung von der Hypoglykämie, gemessen an der Blutglucose, dem Blutlactat und den freien Fettsäuren, nahm einen biphasischen Verlauf. Die schnelle initiale Phase - vermutlich bedingt durch die hepatische Glycogenolyse - blieb von der B-Blocka-de unbeeinflusst; die etwas später einsetzende langsa-me Phase der Regeneration, die der Gluconeogenese zu-geschrieben wurde, hatte sich durch den nicht-selekti-ven B-Rezeptoren-Blocker Propanolol deutlich verschlech-tert. Unter cardioselektiver B-Blockade mit Metopopol hatten sich die Laborparameter nicht signifikant ver-ändert (26).

Eine weitere Rolle im Mechanismus der hormonellen Ge-genregulation auf eine Hypoglykämie kommt dem Prolac-tin zu, dessen diabetogene Wirkung in einigen Arbei-ten untersucht wurde (134, 119, 71): Patienten mit einer Hyperprolactinämie hypophysären Ursprungs zeig-ten eine im Vergleich zu einem Normalkollektiv deutlich verminderte Glucosetoleranz, die sich nach Suppression des Prolactins durch Einnahme von Bromocriptin entschei-dend besserte (71). Wie sich in dieser und anderen Studien ergeben hatte, ist der Hypoglykämie-bedingte hPRL-Anstieg auf Humaninsulin weniger ausgeprägt bzw. fehlend, ein Ergebnis, das in Zusammenschau mit den

erwähnten Beobachtungen eine Konsequenz in der Behandlung diabetischer Patienten mit Humaninsulin, z.B. eine Dosisreduzierung im Vergleich zu konventionellen Insulinen, nach sich ziehen könnte. Spezielle Vor-sichtsmaßnahmen und Informationen für den Patienten werden sicher berechtigt sein.

Der Insulin-Hypoglykämietest ist ein bewährter Test zur Überprüfung der hypothalamisch-hypophysären Funktionsdiagnostik bei Patienten mit Verdacht auf eine Störung dieser Achse oder zur Therapiekontrolle bei gesicherter Diagnose. In dieser Studie ließen ethische Gründe eine Testung mit beiden Insulinspezies an der gleichen Patientengruppe nicht zu. Die Vergleichsstudie zweier Patientengruppen, von denen eine mit Humaninsulin (BHI) und die andere mit Schweineinsulin (PPI) untersucht wurde, erbrachte durchaus vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Ausschüttung gegenregulatorischer Hormone während der Hypoglykämie. Die Insulindosen richteten sich nach der individuellen Glucosetoleranz und waren im Schnitt höher als bei den Probanden. Im Test erschienen beide Insuline gleich gut geeignet zur Untersuchung der hypothalamisch-hypophysären Funktion. Bezüglich der Hypoglykämie-bedingten Symptomatik wies eine etwas geringere Ausprägung der Symptome nach BHI den gleichen Trend wie bei den Probanden auf. Der Unterschied war jedoch insgesamt schwächer ausgeprägt und konnte auch aufgrund der fehlenden Gruppengleichheit schlechter verglichen werden.

Die Ergebnisse der bisher vorliegenden Studien über Humaninsulin plädieren für seine Verwendung im therapeutischen Bereich.

Um zu der Frage einer unterschiedlichen Langzeitwirkung von Humaninsulin im Vergleich zu Insulinen tie-

rischen Ursprungs Stellung nehmen und eine Beurteilung abgeben zu können, werden prospektive Langzeitstudien von Interesse sein. Eine der wichtigsten Voraussetzungen einer guten Stoffwechseleinstellung des diabetischen Patienten werden sicherlich die individuelle Anpassung von Insulin im Hinblick auf Dosis, das Mischungsverhältnis von rasch und verzögert wirkenden Insulinen und die verschiedenen Aspekte der Applikation bleiben (69). Nach bisherigen Erfahrungen mit Humaninsulin könnten Vorteile in der klinischen Anwendung gezogen werden, wenn man seinen möglichen Unterschieden gegenüber konventionellen Insulinen Rechnung trägt.

L I T E R A T U R

- 1 Adeniyi-Jones R.O.C., Jones R.H., Barnes D.G.,
Gerlis L.S., Sönksen P.H. (1983)
Porcine and Human Insulin (Novo): A comparison
of their metabolism and hypoglycemic activity
in normal man.
DIABETES CARE 6 (SUPPL. 1): 9 - 12

- 2 Bachmann W., Sieger C., Lacher F., Lotz H. (1981)
Binding of BHI to Erythrocytes of Normal and In-
sulin-dependent Diabetic Subjects: Comparison
with Pork and Human Pancreatic Insulin.
DIABETES CARE 4: 215 - 219

- 3 Bachmann W., Walter H., Lotz N., Mehnert H. (1982)
Efficiency of Human Insulin (r-DNA) in the Treat-
ment of Diabetic Ketoacidosis and Severe Nonketo-
acidotic Hypoglycemia.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 161 - 164

- 4 Beischer W., Schmid M., Kerner W., Keller L.,
Pfeiffer E.F. (1978)
Does insulin play a role in the regulation of its
own secretion.
HORM METABOL RES 10: 168 - 169

- 5 Bell C.I. et al. (1979)
Nucleotide sequence of a DNA clone encoding
human pre-proinsulin.
NATURE 282: 525

- 6 Bergental R.M., Polonsky K.S., Pons G., Jaspán J.B., Rubenstein A.H. (1983)
Lack of glucagon response to hypoglycemia in type I diabetics after long-term optimal therapy with a continuous subcutaneous insulin infusion pump.
DIABETES 32: 398 - 402
- 7 Berger M., Halban P.A., Girarokei L., Seydoux J., Offord R.E., Renold A.E. (1979)
Absorption kinetics of subcutaneous injected insulin. Evidence for degradation at the injection site.
DIABETOLOGIA 17: 97 - 99
- 8 Beyer J., Enzmann F., Lauerbach M., Althoff P., Bachmann W. et al. (1982)
Treatment with human insulin (r-DNA) in diabetic subjects pretreated with pork or beef insulin. First results of a multicenter study.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 140 - 141
- 9 Beyer J., Weber Th., Schulz G., Hasinger W., Westerburg W., Cordes U. (1981)
Comparison of Biosynthetic Human Insulin and Pork Insulin during rest, food ingestion and physical work in insulin-dependent diabetic subjects using a Glucose Controlled Insulin Infusion System (GCIIS).
DIABETES CARE 4: 189 - 192

- 10 Boden G., Reichard G.A., Holldtke R.D., Rezvain I., Owen O.E. (1981)
Severe insulin-induced hypoglycemia associated with deficiencies in the release of counterregulatory hormones.
NEW ENGL J MED 305: 1200 - 1205
- 11 Boden G., Soriano M., Hoeldtke R.D., Owen O.E. (1983)
Counterregulatory hormone release and glucose recovery after hypoglycemia in non-insulin-dependent diabetic patients.
DIABETES 32: 1055 - 1059
- 12 Bolli G., de Feo P., Compagnucci P., Cartechini M.G., Zega G., Ageletti G., Santeusanio F., Brunetti P., Gerich J.E. (1983)
Abnormal glucose counterregulation in insulin-dependent diabetes mellitus. Interaction of anti-insulin antibodies and impaired glucagon and epinephrine secretion.
DIABETES 32: 134 - 141
- 13 Bolli G., de Feo P., Compagnucci P., Cartechini M., Angeletti G., Santeusanio F., Brunetti P. (1982)
Important role of adrenergic mechanism in acute glucose counterregulation following insulin-induced hypoglycemia in type I diabetes. Evidence for an effect mediated by beta-adreno receptors.
DIABETES 31: 641 - 647

- 14 Bolli G.B., de Feo P., de Cosmo S., Periello G., Bentura M.M., Massi-Benedetti M., Santeusanio F., Gerich J.E., Brunetti P. (1984)
A reliable and reproducible test for adequate glucose counterregulation in type I diabetes mellitus.
DIABETES 33: 732 - 734
- 15 Bolli G., Calabrese G., de Feo P., Compagnucci P., Zega G., Ageletti G., Cartechini M.G., Santeusanio F., Brunetti P. (1982)
Lack of glucagon response in glucose counterregulation in type I (insulin-dependent) diabetics: Absence of recovery after prolonged optimal insulin therapy.
DIABETOLOGIA 22: 100 - 105
- 16 Bottermann P., Ermler R., Henner J. (1972)
A semiautomatic method for immunoassays of insulin and hGH.
HORM METABOL RES 45: 1033
- 17 Bottermann P., Gyaram H., Wahl K., Ermler R., Lebender A. (1981)
Pharmacokinetics of Biosynthetic Human Insulin and characteristics of its effects.
DIABETES CARE 4: 168 - 179
- 18 Brogard J.M., Blickle J.F., Pinget M., Stahl A., Dorner M. (1983)
Biosynthetic human insulin: pharmacokinetics and effects in healthy human volunteers.
INT. J. PHARMACOL. THER. TOXICOL. 21: 575 - 580

- 19 Caleb Mc. M.L., Myers R.D., Singer G., Willis G.
(1979)
Hypothalamic norepinephrine in the rat during
feeding and push-pull perfusion with glucose,
2-DG or insulin.
AM J PHYSIOL 236: 312 - 321
- 20 Castillo M., Nemery A., Verdin E., Lefebvre P.J.,
Luyck A.S. (1983)
Circadian profiles of blood glucose and plasma
free insulin during treatment with semisynthetic
and biosynthetic human insulin, and comparison
with conventional monocomponent preparations.
EUR. J. CLIN. PHARMACOL. 25: 767 - 771
- 21 Chance R.E., Kroeff J.A., Hoffmann J.A., Frank
B.H. (1982)
Chemical, physical and biological properties of
Biosynthetic Human Insulin.
DIABETES CARE 4: 147 - 154
- 22 Charles M.A., Szekeres A., Staten M., Worcester
B., Walsh K.M. (1983)
Comparison of porcine insulin and human insulin
(Novo) using the glucose-controlled insulin in-
fusion system, glucose-insulin dose-response
curves, and the outpatient effectiveness of human
insulin (Novo) in insulin-dependent diabetes.
DIABETES CARE 6 (SUPPL. 1): 29 - 34
- 23 Chisholm D.J., Kraegen E.W., Hewett M.J., Laza-
rus L. (1983)
Comparison of potency of porcine insulin and
semisynthetic human insulin at 3 dose levels
using the euglycemic clamp.
HORM METABOL RES 15: 415 - 418

- 24 Christensen S.E., Smitz O., Hansen A.P., Jensen J., Heding L. (1984)
A double blind study of the efficacy of neutral human and porcine insulin in type I diabetes using a glucose controlled insulin infusion system.
METABOLISM 33: 564 - 868
- 25 Clark A.J., Wiles P.G., Leiper J.M., Knight G., Adeniyi-Jones R.O., Watkins P.J., Ward J.D., Mac Cuish A.C., Keen H., Jones R.H. (1982)
A double blind crossover trial comparing human insulin (r-DNA) with animal insulins in the treatment of previously insulin-treated diabetic patients.

DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 129 - 134
- 26 Corrall R.J.M., Frier B.M., Davidson N.McD., French E.B. (1981)
Hormonal and substrate responses during recovery from hypoglycemia in man during beta₁-selective and non selective beta-adrenergic blockade.
EUROP J OF CLIN INVEST 11: 279 - 283
- 27 Crea R., Kraszewsky A., Tadaaki H., Itakura K., (1978)
Chemical synthesis of genes for human insulin.
PORK NATL ACAD SCI USA 75: 5765 - 5769
- 28 Cryer P.E. (1981)
Glucose counterregulation in man.
DIABETES 30: 261 - 264

- 29 Cryer P.E. (1983)
Hypoglycemia: glucose counterregulation, cardiovascular responses and immunoregulation.
EUROP J OF CLIN INVEST 13: 1 - 2
- 30 Cryer P.E., Gerich J.E. (1983)
Relevance of glucose counterregulatory systems to patients with diabetes: critical roles of glucagon and epinephrine.
DIABETES CARE 6: 95 - 99
- 31 Deckert T., Anderson O.O., Grundahl K., Kerp L. (1972)
Isoimmunization of man by recrystallized human insulin.
DIABETOLOGIA 8: 358 - 361
- 32 Diem P., Teuscher A. (1979)
Immunologische Untersuchungen mit vollsynthetischem humanen Insulin bei Patienten mit Diabetes mellitus.
SCHWEIZ. MED. WSCHR. 109: 1814 - 1816
- 33 Dolan-Heitlinger J. (1982)
Neukombinierte DNA und biosynthetisches Humaninsulin - ein Quellenbuch.
ELI LILLY AND COMPANY, FORSCHUNGSABTEILUNG,
2. AUFLAGE 1982
- 34 Ebihara A., Kondo K., Ohashi K., Kosaka K., Kuzuya T., Matsuda A. (1983)
Comparative clinical pharmacology of human insulin (Novo) and pork insulin in normal subjects.
DIABETES CARE 6 (SUPPL. 1): 17 - 22

- 35 Ebihara A., Kondo K., Ohasi K., Kosaka K.,
Kuzuya T., Tarui S. (1982)
Clinical pharmacology of human insulin of re-
combinant DNA origin in healthy volunteers.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 35 - 38
- 36 Etti H., Bamberg E., Enzmann F., Haupt E.
(1983)
Biosynthetisches Humaninsulin im Vergleich zu
herkömmlichen Intermediärinsulinen vom Rind.
MED. WELT 34: 1007 - 1009
- 37 Etti H., Haupt E. (1983)
Biosynthetisches Humaninsulin: Vergleich der
Wirkungsprofile von Human-NPH-Insulin und
Schweine-NPH-Insulin bei Typ-I-Diabetikern.
MMW 125 (SUPPL. 1): 53 - 56
- 38 Federlin K., Laube H., Mäser E., Velkowsky H.G.
(1983)
Immunologische Beobachtungen bei Primär- und
Sekundärbehandlung von Diabetikern mit Human-
insulin.
MMW 125 (SUPPL. 1): 101 - 107
- 39 Federlin K., Laube H., Velkowsky H.G. (1981)
Biological and immunological in vivo and in
vitro studies with biosynthetic human insulin.
DIABETES CARE 4: 170 - 174
- 40 Fineberg S.E., Galloway J.A., Fineberg N.S.,
Rathbun M.J. (1982)
Immunologic improvement resulting from the transfer
of animal insulin-treated diabetic subjects to a
human insulin (r-DNA)
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 107-113
- 41 Fineberg S.E., Galloway J.A., Fineberg N.S. (1983)
Immunogenicity of recombinant DNA human insulin.
DIABETOLOGIA 25: 465-469

- 42 Galloway J.A., Peck F.B., Fineberg S.E.,
Spradlin C.T., Marsden J.H., Allemenos D.,
Ingulli-Fattic J. (1982)
The US "New Patient" and "Transfer" Studies.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 135 - 139
- 43 Galloway J.A., Root M.A., Bergstrom R., Sprad-
lin C.T., Howey D.C., Fineberg S.E., Jackson R.L.
(1982)
Clinical pharmacologic studies with human in-
sulin (r-DNA).
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 13 - 22
- 44 Galloway J., Spradlin C.T., Root M.A., Fine-
berg S.E. (1981)
The plasma glucose response of normal fasting
subjects to neutral regular and NPH biosynthe-
tic human and purified pork insulins.
DIABETES CARE 4: 183 - 188
- 45 Gerich J., Langlois M., Noacco C., Karam J.H.,
Forsham P.H. (1973)
Lack of glucagon response to hypoglycemia in
diabetics: evidence for an intrinsic pancreatic
alpha-cell defect.
SCIENCE 182: 171 - 173
- 46 Goedel P.V., Kleid D.G., Bolivar F. et al.
(1979)
Expression in E.coli of chemically synthesized
genes for human insulin.
PORK NATL ACAD SCI USA 76: 106 - 110

- 47 Gottswinter J., Ziegler R. (1982)
Klinische Aspekte hypophysärer Erkrankungen
(Tumoren) Anstöße zur Diagnostik.
DIAGNOSTIK 15: 975 - 981
- 48 Greene S.A., Smith M.A., Cartwright B., Baum
J.D. (1983)
Comparison of human versus porcine insulin in
treatment of diabetes in children.
BR. MED. J. (CLIN. RES.) 287 : 1578 - 1579
- 49 Gyaram H., Bottermann P., Wahl K., Ermler R.,
Lebender A. (1983)
Wirkprofil unterschiedlicher Zubereitungsfor-
men.
MMW 125 (SUPPL. 1): 48 - 52
- 50 Hales C.N., Randle P.I. (1963)
Immunoassay of insulin with insulin antibody
precipitate.
BIOCHEM. J. 88: 137 - 146
- 51 Heding L.G. (1971)
Radioimmunological determination of pancreatic
and gut glucagon in plasma.
DIABETOLOGIA 7: 10 - 19
- 52 Heine R.J., Ponchner M., Hanning I., Home P.D.,
Brown M., Williams D., Alberti K.G. (1984)
A comparison of the effects of semisynthetic
human insulin and porcine insulin on transmembrane
ion shifts and glucose metabolism during euglycemic
clamping.
ACTA ENDOCRINOL (COPENH) 106: 241 - 247

- 53 Holman R.R., Steemson J., Darling P., Reeves W.G., Turner R.C. (1984)
Human ultralente insulin.
BR. MED. J. (CLIN. RES) 288: 665 - 668
- 54 Home P.D., Massi-Benedetti M., Shepherd G.A.A., Hanning J., Alberti K.G.M.M., Owens D.R. (1982)
A comparison of the activity and disposal of semisynthetic human insulin and porcine insulin in normal man by the glucose clamp technique.
DIABETOLOGIA 22: 41 - 45
- 55 Howey D.C., Fineberg S.E., Nolen P.A., Stone M.I., Gibson R.G., Fineberg N.S., Galloway J.A. (1982)
The therapeutic efficacy of human insulin (r-DNA) in patients with insulin-dependent diabetes mellitus: a comparative study with purified pork insulin.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 73 - 77
- 56 Iavicoli M., Di Mario U., Coronel G.A., Dawud A.M., Arduini P., Leonardi M. (1984)
Semisynthetic human insulin: biologic and immunologic activity in newly treated diabetic subjects during a six month follow up.
DIABETES CARE 7: 128 - 131
- 57 Jenny M. (1970)
Die Beziehungen zwischen hypophysen- und Nebennierenrindenfunktion.
ACTA CLINICA, DOCUMENTA GEIGY 10, 1970

- 58 Karam J.H., Etzwiler D.D., eds. (1983)
International symposion on human insulin.
DIABETES CARE 6 (SUPPL. 1): 1 - 68
- 59 Keen H., Pickup J.C., Bilous R.W., Glynne A.,
Viberti G.C., Jarrett R.G., Marsden R. (1980)
Human insulin produced by recombinant DNA
technology: safety and hypoglycemic potency
in healthy men.
THE LANCET 23: 398 - 401
- 60 Keefer L., Piron M.A., de Meyts P. (1981)
Receptor binding properties and biological
activity in vitro of BHI.
DIABETES CARE 4: 209 - 214
- 61 Kemmer F.W., Sonnenberg G., Cüppers H.J.,
Berger M. (1982)
Absorption kinetics of semisynthetic human in-
sulin and biosynthetic (r-DNA) human insulin.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 23 - 28
- 62 Keppens S., de Wulf H. (1974)
The activation of liver glycogen phosphorylase
by vasopressin.
FEBS LE 51: 29 - 32
- 63 Kerner W., Pfeiffer E.F. (1982)
Humaninsulin - Herstellung, Wirkung und thera-
peutische Anwendung.
DEUTSCHES ÄRZTEBLATT 79: 25 - 30

- 64 Klier M., Kerner W., Torries A.A., Pfeiffer E.F.
(1981)
Comparison of the biological activity of bio-synthetic human insulin and natural pork insulin in juvenile-on-set diabetic subjects assessed by the glucose controlled insulin infusion system.
DIABETES CARE 4: 193 - 195
- 65 Kumar D., Alexander C.M., Zeidler A., Rhodes J.J., Voarman C.C., Hoopes M.T. (1983)
Immunoreactivity of human insulin of recombinant DNA origin.
DIABETES 32: 516 - 519
- 66 Lager J., Jagenburg L., v.Schenck H., Smith U.
(1980)
Effect of beta-blockade on hormone release during hypoglycaemia in insulin dependent diabetics.
ACTA ENDOCRIN 95: 364 - 371
- 67 Landgraf R. (1980)
Diagnostik und Einstellung des Diabetes mellitus.
DIE HEILKUNST 93: 1 - 9
- 68 Landgraf R., Kammerer S., Bock T., Smolka B., Ladik T., Enzmann E., Landgraf-Leurs M.M.C.
(1982)
Crossover study with human insulin (r-DNA) in Type I Diabetic subjects.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 39 - 42
- 69 Landgraf R., Landgraf-Leurs M.M.C. (1983)
Anwendung fixer Kombinationszubereitungen aus BHI-Normal und BHI-Basal (NPH) beim Typ I Diabetiker.
MMW 125 (SUPPL. 1): 63 - 68

- 70 Landgraf R., Landgraf-Leurs M.M.C. (1983)
Humaninsulin - ein Vorteil?
DIAGNOSTIK 16: 37 - 40
- 71 Landgraf R., Landgraf-Leurs M.M.C., Weissmann
A., Hörl R., v.Werder K., Scriba P.C. (1977)
Prolactin: A diabetogenic hormone.
DIABETOLOGIA 13: 99 - 104
- 72 Laube H., Velkowsky H.G., Federlin K. (1981)
Semisynthetisches Humaninsulin - vergleichende
Untersuchung über Stoffwechseldefekte beim
Menschen.
ACTA ENDOKRIN 2: 102
- 73 Lingse J., Vestermark S. (1983)
The efficacy and safety of human insulin (Novo)
in insulin-dependent diabetic patients.
DIABETES CARE 6(SUPPL. 1): 53 - 55
- 74 Lotz N., Bachmann W., Mehnert H. (1982)
Human insulin (r-DNA) in the treatment of
patients with newly diagnosed insulin-dependent
diabetes mellitus (IDDM).
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 149 - 151
- 75 Märki F., Albrecht W. (1977)
Biological activity of synthetic human insulin.
DIABETOLOGIA 13: 293 - 295
- 76 Maneschi F., Fineberg S.E., Kohner E.M. (1982)
Successful treatment of immune-mediated insu-
lin-resistance by human insulin.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 175 - 179

- 77 Markussen J. et al. (1981)
Charakterisierung des aus Schweineinsulin präpa-
rierten Humaninsulins.
ACT ENDOKRIN 2: 104
- 78 Markussen J. et al. (1981)
Umwandlung von Schweine- zu Humaninsulin (Ab-
bildung).
HUMAN MONOCOMPONENT INSULIN - CHEMISTRY AND
CHARACTERISTICS. VORTRAG MAI 1981
- 79 Marschner I., Erhardt F., Scriba P.C. (1974)
Calculations of the radioimmunoassay standard
curve by "spline function".
RADIOIMMUNOASSAY AND RELATED PROCEDURES IN MEDI-
CINE 1
- 80 Massi-Benedetti M., Burrin J.M., Capaldo B.,
Alberti K.G.M.M. (1981)
A comparative study of the activity of biosynthe-
tic human insulin and pork insulin using the glu-
cose clamp technique in normal subjects.
DIABETES CARE 4: 163 - 167
- 81 Meyts de P., Halban P., Hepp K.D. (1981)
In vitro studies on biosynthetic human insulin:
an overview.
DIABETES CARE 4: 144 - 146
- 82 Mirouze J., Monnier L., Richard J.L., Gancel A.,
Sona K.B. (1982)
Comparative study of NPH human insulin in diabe-
tic subjects: preliminary report.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 60 - 62

- 83 Müller O.A., Fink R., Baur X., Bauer M.E., Madler M., Scriba P.C. (1978)
ACTH im Plasma: Extraktion und Bestimmung.
LAB.MED.2: 117 - 124
- 84 Müller-Esch G., Ball P., Bekemeyer U., Heidebüchel K., Kraas E. Wood W G., Scriba P.C. (1983)
Keine Wirkungsunterschiede zwischen biosynthetischem Humaninsulin (BHI) und Schweineinsulin (PI) im GCIIIS-gesteuerten Insulinhypoglykämietest (IHT).
WIEN.MED.WSCHR. 133 (SUPPL. 76): 17
- 85 Noel G.L., Suh H.K., Stone J.G., Frantz A.G. (1972)
Human prolactin and growth hormone release during surgery and other conditions of stress.
J. CLIN. ENDOCRINOL. METABOL. 35: 840 - 851
- 86 Novo Produktinformation
Human Monocomponent Insulin
NOVO INDUSTRIE GMBH, 6500 MAINZ
- 87 Owens D.R., Jones M.K., Hayes T.M., Heding L.G., Alberti K.G.M.M., Home P.D., Burrin J.M., Newcombe R.G. (1981)
Human insulin: study of safety and efficacy in man.
BR. MED. J. 282: 1264 - 1266

- 88 Owens D.R., Jones M.K., Birtwell J. et al.
(1982)
A study of the comparative safety and efficacy
of neutral soluble human (semisynthetic) and
porcine monocomponent insulin in non-diabetic
subjects.
DIABETE METABOL. 8: 155 - 158
- 89 Owens D.R., Jones M.K., Birtwell A., Jones J.R.,
Hayes T.M., Heding L.G. (1983)
The clinical pharmacology of human insulin (Novo)
in normal subjects.
DIABETES CARE 6 (SUPPL. 1): 13 - 16
- 90 Passon P.G., Peuler J.D. (1973)
Original-Einzelisotopen-Radioenzymatischer Assay
für Catecholamine.
ANALYT. BIOCHEM. 51: 618 - 631
- 91 Petersen K.G., Schlüter K.J., Kerp L. (1982)
Less pronounced changes in serum potassium and
epinephrine during hypoglycemia induced by human
insulin (r-DNA).
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 90 - 92
- 92 Petersen K.G., Schlüter K.J., Kerp L. (1982)
Die Wirkung von Human- und Schweineinsulin auf die
Catecholaminausschüttung in der Hypoglykämie.
NEUE INSULINE, EIGENVERLAG FREIBURG S. 73 - 78
- 93 Petersen K.G., Schlüter K., Steinhiller S.,
Kerp L. (1981)
Binding of BHI to human antibodies and receptors.
DIABETES CARE 4: 248 - 249

- 94 Pfeiffer E.F. (1983)
Fortschritte in der Insulin-Therapie.
MÜNCH. MED. WSCHR. 125 (SUPPL. 1): 1 - 136
- 95 Peuler J.D., Johnson G.A. (1977)
Simultaneous singl isotope radioenzymatic assay
of plasma norepinephrine, epinephrine and dopa-
mine.
LIFE SCIENCE 21: 625 - 636
- 96 Raptis S., Hatzidakis D., Enzmann F., Raptis A.,
Diamantopoulos E. (1983)
Hemmung der Arginin-stimulierten pankreatischen
Glucagon-Sekretion durch BHI und PPI beim Gesun-
den und Diabetiker.
MMW 125 (SUPPL. 1): 38 - 43
- 97 Raptis S., Karaiskos C., Enzmann F., Hatzidakis D.,
Zoupas C., Souvatzoglou A., Diamantopoulos E.,
Mouloupoulos S. (1981)
Biological activities of biosynthetic human insulin in
healthy volunteers and insulin-dependent diabetic patients
monitored by the artificial endocrine pancreas.
DIABETES CARE 4: 155 - 162
- 98 Rjosk H.K., v. Werder K. (1980)
Prolactin.
KURZMONOGRAPHIEN SANDOZ (26), SANDOZ Nürnberg 1980
- 99 Rosak C., Althoff P.H., Enzmann F., Schöffling K.
Comparative studies on intermediary metabolism
and hormonal counterregulation following human
insulin (r-DNA) and purified pork insulin in man.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 82 - 89

- 100 Rosak C., Althoff P.H., Widerspahn P.,
Schöffling K. (1982)
Semisynthetisches Humaninsulin - akute endokrine
und metabolische Effekte und Charakteristik der
Hypoglykämie-induzierten Gegenregulation.
AKTUEL. ENDOKRIN.STOFFW. 3: 98
- 101 Schadewaldt H. (1972)
Die Geschichte des Diabetes.
IN "DIABETES IM BILD", HOECHST AG, PHARM.MED.
ABTEILUNG, FRANKFURT/MAIN 1972
- 102 Schernthaler G. (1982)
Affinity of IgG-insulin antibodies to human
(r-DNA) insulin and porcine insulin in insulin-
treated diabetic individuals with and without
insulin resistance.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 114 - 118
- 103 Schernthaler G., Borkenstein M., Fink M., Mathä
R., Schober E., Susani M. (1982)
Langzeiterfahrungen mit der Humaninsulintherapie
bei 40 Typ I Diabetikern.
AKT. ENDOKR. STOFFW. 2: 113 - 114
- 104 Schernthaler G., Borkenstein M., Fink M., Mayr
W.R., Menzel J., Schober E. (1983)
Immunogenicity of human insulin (Novo) or pork
monocoponent insulin in HLA-DR-Typed insulin
dependent diabetic individuals.
DIABETES CARE 6 (SUPPL. 1): 43 - 48

- 105 Schernthaler G., Ludwig H., Jarisch B., Brun-
 eder H. (1981)
 Immediate-Type allergy against insulin itself:
 clinical and immunological studies on a diabe-
 tic patient with insulin intolerance.
 DIABETES CARE 4: 196 - 201
- 106 Schlichtkrull J. (1979)
 Insulin in perspective.
 IDF BULLETIN 24: 7 - 10
- 107 Schlüter K.J., Enzmann F., Kerp L. (1983)
 Different potencies of biosynthetic human and
 purified porcine insulin.
 HORM. METABOL. RES. 15: 271 - 274
- 108 Schlüter K.J., Kerp L. (1982)
 Receptor binding studies and clinical effects
 of human insulin (r-DNA): studies in patients
 with newly diagnosed type I diabetes, type II
 diabetes, insulin-resistance (type A and type
 B) and Brittle-Diabetes.
 DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 152 - 160
- 109 Schlüter K.J., Andre J., Enzmann F., Kerp L.
 (1984)
 Insulin receptor binding in pork brain: diffe-
 rent affinities of porcine and human insulin.
 HORM. METABOL. RES. 16: 411 - 414
- 110 Schlüter K.J., Kerp L. (1983)
 Hormonelle Gegenregulation nach Human- und
 Schweineinsulin.
 MMW 125 (SUPPL. 1): 116 - 120

- 111 Schlüter K.J., Petersen K.G., Sontheimer J.,
Enzmann F., Kerp L. (1982)
Different counterregulatory responses to human
insulin and purified pork insulin.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 78 - 81
- 112 Schöffling K. (1983)
Einfluß von BHI auf den Intermediärstoffwechsel.
DIABETES DIALOG 1: 2 (ELI LILLY GMBH)
- 113 Schöffling K., Rosak C., Fassbinder W., Alt-
hoff P.H. (1983)
Einfluß von biosynthetischem Humaninsulin und
hochgereinigtem Schweineinsulin auf den Inter-
mediärstoffwechsel und die hormonelle Gegen-
regulation beim Menschen. Vergleichende Unter-
suchungen.
MMW 125 (SUPPL. 1): 26 - 30
- 114 Schumm P.M., Rosak C., Jungmann E., Althoff
P.H., Schöffling K. (1982)
Zur Effektivität von semisynthetischem Human-
insulin bei der Ersteinstellung von Diabetikern.
AKTUEL. ENDOKRIN. STOFFW. 3: 114
- 115 Scriba P.C., v. Werder K. (1979)
Hypothalamus und Hypophyse.
IN SIEGENTHALER: KLINISCHE PATHOPHYSIOLOGIE,
THIEME STUTTGART 1979, 286 - 315
- 116 Selye H. (1946)
The general adaptation syndrome and diseases
of adaptation.
J. CLIN. ENDOCR. 6: 117

- 117 Sestoft L., Hildebrandt P., Birch K., Gammel-
toft S. (1981)
Vergleich von Humaninsulin mit Schweineinsulin:
klin. Effekt bei Diabetikern, Absorption und
Insulinrezeptorbindung.
ABSTRACT, VORTAG MAI 1981, LINKÖPING, SCHWEDEN
- 118 Sieber P., Kamler B., Hartmann A., Jöhl A.,
Riniker B., Rittel W. (1974)
Totalsynthese von Humaninsulin unter gezielter
Bildung von Disulfidbindungen.
HELV. CHIM. ACTS 57: 2617 - 2621
- 119 Sinhoff M.W., De Bodo R.C. (1953)
Prolactin as an insulin antagonist.
ARCH. EXP. PATH. PHARMAKOL. 219: 100 - 110
- 120 Sinha Q.N., Seliby F.W., Lewis V.J., Vander-
laan W.P. (1973)
A homologous RIA for h-Prolactin.
J. CLIN. ENDOCRINOL. 36: 509
- 121 Skyler J.S., Raptis S. (1981)
Symposion on biosynthetic human insulin.
DIABETES CARE 4: 139 - 264
- 122 Skyler J.S. ed. (1982)
Symposion on human insulin of recombinant DNA
origin.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 1 - 186
- 123 Sonnenberg G.E., Chantelau E., Sundermann S.,
Hauff C., Berger M. (1982)
Human and porcine regular insulin are equally
effective in subcutaneous replacement therapy.
DIABETES 31: 600 - 602

- 124 Sonnenberg G., Kemmer F., Cüppers H.J., Berger M.
(1983)
Subcutaneous use of regular human insulin (Novo):
Pharmacokinetics and continuous insulin infusion
therapy.
DIABETES CARE 6 (SUPPL. 1): 35 - 39
- 125 Spijker A.J., Poortman J., Thijssen J.H.H.,
Erkelens D.W. (1982)
Decrease of circulating insulin antibodies in
two patients treated with continuous subcutaneous
infusion of human insulin (r-DNA).
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 171 - 174
- 126 Stalla G.K., Gieseemann G., Müller O.A., Wood
W.G., Scriba P.C. (1981)
The development of a direct homologous radio-
immunoassay for serum cortisol.
J. CLIN. CHEM. CLIN. BIOCHEM. 19: 427 - 434
- 127 Staten M., Worcester B., Szerkeres A., Waldeck
N., Ascher M., Walsh K.M., Rizza R., Gerich J.,
Charles M.A. (1984)
Comparison of porcine and semisynthetic human
insulin using euglycemic clamp-derived glucose-
insulin dose-response curves in insulin-depen-
dent diabetes.
METABOLISM 33: 132 - 135
- 128 Stout R.W. (1979)
Diabetes and Atherosclerosis - The role of
insulin.
DIABETOLOGIA 16: 141 - 150

- 129 Struwe F.W. (1983)
Humaninsulin und Rinderinsulin im Vergleich.
Erste klinische Erfahrungen mit der Einstellung
diabetischer Kinder auf biosynthetisches Human-
insulin.
MMW 125 (SUPPL. 1): 112 - 115
- 130 Sundermann S., Hauff C., Cüppers H.J., Broer-
mann C., Schütte M., Berger M. (1981)
Absorptionskinetik und biologische Aktivität
von semisynthetischem Humaninsulin (Novo).
AKT. ENDOKRIN 2: 116
- 131 Szabo O., Szabo A.J. (1975)
Studies on the nature and mode of action of
the insulin-sensitive glucoregulator receptor
in the central nervous system.
DIABETES 24: 328 - 336
- 132 Szerkeres A., Worcester B., Ascher M.S., Tuxen D.,
Heyendal R., Walsh K.M., Charles M.A. (1983)
Comparison of the biological activity of porcine
and semisynthetic human insulin.
DIABETES CARE 6: 193 - 196
- 133 Teuscher A. (1979)
Die biologische Wirkung von vollsynthetischem
humanen Insulin bei Patienten mit Diabetes
mellitus.
SCHWEIZ. MED. WSCHR. 109: 743 - 747

- 134 Tourniaire J., Pallo D., Pousset G., Bizollon C.,
Bachelot J. (1974)
Diminution de la tolerance glucidique et hyper-
insulinique dans l'adenome a prolactine.
NOUV. PRESSE MED. 3: 1705 - 1707
- 135 Velkowsky H.G., Federlin K.F. (1982)
Insulin-specific IgG and IgE antibody response
in type I diabetic subjects exclusivaly treated
with human insulin (recombinant DNA).
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 126 - 128
- 136 Viberti G.C., Pickup J.C., Keen H., Biluos R.W.,
Mattock M., Jarret R.J., Glynne A., Rogers R.
Biosynthetic human insulin: effects in healthy men
on plasma glucose and non-esterified fatty acids
in comparison with highly purified pork insulin.
DIABETES CARE 4: 175-179
- 137 Vigas M., Malatinsky J., Nemeth S., Jurcovicova J.
(1977)
Alpha-adrenergic control of growth hormone release
during surgical stress in man.
METABOLISM 26: 399 - 402
- 138 Weinges F. (1983)
Wirkung von sieben Zubereitungsformen des biosyn-
thetischen Humaninsulins im Geritzen-Test.
MMW 125 (SUPPL. 1): 44 - 47

- 139 Weinges K., Ehrhardt M., Nell G., Enzmann F.
(1982)
Pharmacodynamics of human insulin (r-DNA)-regular, -NPH and -mixtures - obtained by the Geritzen-method in healthy volunteers.
DIABETES CARE 5 (SUPPL. 2): 67 - 70
- 140 Werder v.K., (1975)
Wachstumshormone und PRL-Sekretion des Menschen.
URBAN UND SCHWARZENBERG, BERLIN, HEIDELBERG 1975
- 141 Werder v.K. (1976)
Prolactin - Neue klinische Bedeutung eines phylogenetisch alten Hormons.
FORTSCHR. MED. 94: 189 - 195
- 142 Werder v.K. (1982)
Diagnostik hypothalamo-hypophysärer Erkrankungen.
DIAGNOSTIK 15: 971 - 974 (1982)
- 143 Woods S.C., Porte D. (1974)
Neural control of the endocrine pancreas
PHYSIOL REV 54: 596 - 619
- 144 World Health Organisation (1980)
WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus.
SECOND REPORT TECHNICAL REPORT SERIES 646, GENEVA
1980
- 145 Yalow R.S., Berson S.A. (1961)
Immunological specificity of human insulin: applocation to immuno assay of insulin.
J. CLIN. INVEST.40: 2190 - 98

Der klinische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1982 bis Juni 1983 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. med. R. Landgraf möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, sein großes Interesse und die Korrektur der Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. med. M.M.C. Landgraf-Leurs für ihre große Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit, vornehmlich bei der Bearbeitung des statistischen Teils.

Herzlich danken möchte ich Frau S. Kammerer, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und einen großen Teil des organisatorischen Aufwandes sowie der laboranalytischen Arbeit zu tragen hatte.

Mein Dank auch Herrn Dr. med. A. König für die Ausarbeitung der Rechenprogramme zur statistischen Auswertung der Daten. Den Laborleitern sowie allen Mitarbeitern der Labors von Dr. med. R. Lorenz, Prof. Dr. med. O.A. Müller, Dr. med. G.K. Stalla und Prof. Dr. med. K.V. Werder sei mein Dank ausgesprochen.

Bei Frau Petri möchte ich mich für die Erstellung der Diagramme bedanken.

LEBENS LAUF

Am 15.12.54 wurde ich, Inge Brügelmann, als Tochter des Arztes Dr. Hanns Brügelmann und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Munsch, in Rosenheim geboren.

Von 1961 - 1965 besuchte ich die Mädchen-Volksschule in Rosenheim und trat im September 1965 in das Ignaz-Günther-Gymnasium in Rosenheim ein, wo ich 1974 das Abitur ablegte. Von 1975 - 1977 absolvierte ich eine Ausbildung als Medizinisch Technische Assistentin und trat im Anschluß daran eine Anstellung als Medizinisch Technische Assistentin am Institut für Medizinische Psychologie der Universität München an.

Im Wintersemester 1978 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Humanmedizin, das ich im Oktober 1984 mit dem Staatsexamen abschloß.

